



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Enzymologie Moléculaire

par **Arnaud Pailot**

**Caractérisation enzymatique et biochimique du site actif de la
Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase non-phosphorylante de
*Streptococcus mutans***

Soutenue publiquement le 15 novembre 2006 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme. M. Reboud-Ravaux	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris-VI
	Mr. J.P. Samama	Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg
Examineurs :	Mr. J. Magdalou	Directeur de Recherche CNRS, Nancy
	Mme. C. Corbier	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I
	Mr. M.T. Cung	Directeur de Recherche CNRS-ENSIC, INPL
	Mr. G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I (Directeur de thèse)
Invité :	Mr. F. Talfournier	MCF, Université Henri Poincaré, Nancy-I (Co-directeur de thèse)

Je tiens à remercier Madame Christiane Branlant, Directeur de l'UMR CNRS-UHP 7567, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie également Monsieur le Professeur Guy Branlant, responsable de l'équipe d'Enzymologie Moléculaire, qui m'a accordé sa confiance en acceptant de diriger mon travail de thèse malgré une interruption de deux ans de mes études. Les discussions que nous avons eues m'ont permis d'acquérir une rigueur et une réflexion nécessaires au travail de recherche. Il a su me guider dans mes travaux jusqu'à la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Madame Michèle Reboud-Ravaux, Professeur à l'Université de Paris VI, et à Monsieur le Docteur Jean-Pierre Samama, Directeur de recherche au CNRS de Strasbourg, qui me font l'honneur de juger ce travail. J'associe à ces remerciements Madame le Professeur Catherine Corbier et Messieurs les Docteurs Manh Thong Cung et Jacques Magdalou qui ont acceptés de juger cette thèse.

Je voudrais témoigner à Monsieur le Docteur François Talfournier ma plus profonde gratitude pour avoir coencadré ce travail depuis le DEA. Ses conseils ainsi que les nombreuses discussions scientifiques ou sportives que nous avons eues ensemble ont rendu cette thèse plus agréable. Je tiens également à remercier Céline et Noémie pour la patience dont elles ont fait preuve lorsque j'avais « besoin » de François.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Catherine Corbier et Mademoiselle le Docteur Katia D'Ambrosio du groupe de Biocristallographie de Nancy pour leur fructueuse collaboration.

Mes remerciements vont aussi à Sandrine Boschi-Muller, Sophie Rahuel-Clermont et Christophe Jacob avec qui les discussions ont toujours été enrichissantes. Merci également à Arnaud Gruez pour son aide lors de la rédaction de ce mémoire et à Sandjiv Sonkaria pour son aide lors de la rédaction des publications.

La qualité de l'équipe d'Enzymologie Moléculaire ne serait rien sans l'aide technique, passée ou présente, de Séverine, Carine, Christophe, Alex et Saïd.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire pour leur bonne humeur et leur sympathie. En particulier Jacky, notre Moun' nationale, sans qui ce labo ne ressemblerait en rien à ce qu'il est aujourd'hui.

Merci également à tous les gens de mon ancien club de Longuyon, ma ville natale. Romain, Philippe, Val & Alex, les deux frangins, Noël, Chab', Bidon, Bono, merci pour les soirées aux 3B et tous les délires passés, présents et futurs. J'en profite pour remercier mes coéquipiers du club de hand de Jarville et en particulier Julie & Thom, mon coach.

Ce travail n'aurait pas été le même sans le soutien de vrais amis. Je pense à Sylvain & Marlène, Xav' & Laure, Nico, Lionnel, Axel & Gaby, Jimmy. Je remercie de tout mon cœur Aileen & Athanase pour les nombreuses soirées où ils ont du me supporter.

A l'heure de ma soutenance, j'aurai une pensée sincère pour celui qui me considère comme son jumeau de thèse, Mathias, qui a décidé de rejoindre les Etats-Unis.

Je voudrais adresser un remerciement tout particulier à Adeline, qui a toujours su me comprendre et m'apprécier, surtout quand je devenais la personne la plus pénible du monde.

J'adresse un grand merci à Rachel qui m'a soutenu et encouragé jusque dans les moments les plus pénibles. J'associe à ces remerciements toute sa famille. Je voudrais rendre hommage à Christian, son papa, qui nous a quitté trop tôt, emporté par la maladie.

Enfin, je tiens à saluer le courage de ma famille, mes oncles et tantes, cousins et cousines, qui ont réussi à me supporter jusqu'à la fin de ce travail, et ma pounet' pour sa fidélité. Je tiens particulièrement à remercier et à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance aux trois personnes qui m'ont permis de devenir ce que je suis, mes grands-parents, Odette & Michel, et ma Maman, Marie-José. Merci à tous les trois pour les sacrifices dont vous avez fait preuve afin que j'atteigne le but que je m'étais fixé.

A tous MERCI !

Sommaire

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE1

1. Les aldéhydes : des composés aux effets biologiques antagonistes.....	1
1.1. Implication dans les processus physiologiques.....	1
1.1.1. Le glycéraldéhyde-3-phosphate.....	1
1.1.2. Le rétinaldéhyde.....	3
1.2. Effets toxiques.....	4
1.2.1. Alcoolisme et toxicité cellulaire : rôle de l'acétaldéhyde.....	4
1.2.2. Aldéhydes générés lors de la peroxydation des lipides.....	5
2. Systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des aldéhydes.....	7
2.1. Les monooxygénases P450.....	7
2.2. Les aldo-céto réductases (AKR).....	10
2.3. Les aldéhyde oxydases à cofacteur molybdoptérine (AO).....	12
2.4. Les alcool déshydrogénases (ADH).....	14
2.5. Les glutathion-S-transférases (GST).....	15
3. Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)	16
3.1. Rôles <i>in vivo</i> des ALDH	17
3.1.1. Les ALDH phosphorylantes	17
3.1.2. Les ALDH non phosphorylantes	18
3.1.2.1. Nomenclature.....	18
3.1.2.2. Implication dans le métabolisme cellulaire.....	19
3.1.2.3. Implication dans la communication synaptique.....	20
3.1.2.4. Rôles des ALDH dans l'appareil visuel.....	21
3.1.2.5. Implication dans le développement embryonnaire.....	22
3.1.2.6. Implication des ALDH dans certaines pathologies.....	23
3.1.2.7. ALDH et cancers.....	24
3.1.2.8. Les ALDH en tant que protéines de structure.....	26
3.1.2.9. Quelques exemples de rôles physiologiques des ALDH CoA dépendantes	27
3.1.2.10. Rôles physiologiques de la glycéraldéhyde -3- phosphate déshydrogénase non phosphorylante (GAPN).....	28
3.1.2.10.1. Chez les organismes photosynthétiques.....	28
3.1.2.10.2. Chez les organismes non photosynthétiques.....	29
3.1.2.10.3. Un cas particulier : la GAPN de <i>Thermoproteus tenax</i>	30

3.1.2.10.4. Régulation de l'activité de GAPN.....	31
3.2. Structures tridimensionnelles des ALDH.....	31
3.2.1. Les ALDH phosphorylantes	31
3.2.2. Les ALDH non phosphorylantes	33
3.2.2.1. Structure du monomère.....	34
3.2.2.1.1. Le domaine de fixation du cofacteur	34
3.2.2.1.2. Le domaine catalytique.....	34
3.2.2.1.3. Le domaine d'oligomérisation.....	35
3.2.2.2. Organisation quaternaire.....	35
3.2.2.3. Mode de liaison du cofacteur.....	36
3.3. Mécanisme réactionnel des ALDH.....	39
3.3.1. Les ALDH phosphorylantes.....	39
3.3.1.1. Mécanisme cinétique	39
3.3.1.2. Mécanisme catalytique.....	39
3.3.2. Les ALDH non phosphorylantes	41
3.3.2.1. Mécanisme cinétique	41
3.3.2.2. Mécanisme catalytique.....	42
3.3.2.2.1. Etape d'acylation.....	42
3.3.2.2.2. Etape d'hydrolyse.....	45
3.3.2.2.3. Nécessité d'une isomérisation conformationnelle du cofacteur au cours de la catalyse.....	47
3.3.2.3. Propriétés cinétiques particulières de certaines ALDH non phosphorylantes	48
3.3.2.3.1. Influence des cations métalliques sur la catalyse.....	48
3.3.2.3.2. Réactivité de demi-site.....	49
Objectifs	52
RESULTATS.....	54
Partie I	54
1. Rôle du résidu T244 dans l'étape d'acylation	54
1.1. Rôle du groupement β -CH ₃ de la T244.....	54
1.2. Rôle du groupement β -OH de la T244.....	56

<i>Publication 1</i>	58
1.3. Résultats non mentionnés dans la publication	68
2. Caractérisation de la conformation adoptée par le NADP(H) après le transfert d'hydrure	71
<i>Publication 2</i>	73
Partie II	82
1. Etude de l'environnement protéique autour du résidu E268	82
1.1. Etudes des propriétés catalytiques des mutants générés.....	83
1.2. Mutant L174A.....	85
1.3. Mutant L427G.....	86
1.4. Mutant de la position 465	88
1.4.1. Mutant F465Y.....	88
1.4.2. Mutant F465L	91
1.4.3. Mutant F465G.....	91
2. Caractérisation préliminaire des propriétés de coopérativité de la GAPN de <i>S. mutans</i>	93
2.1. Mise en évidence de l'existence de deux populations de sites actifs au sein du tétramère	93
2.2. Rôle de la boucle 453-474	94
<i>DISCUSSION-PERSPECTIVES</i>	97
<i>MATERIELS & METHODES</i>	111
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	126

Abréviations

Abréviations

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Pseudomonas sp. CF600</i>	<i>Pseudomonas specis CF600</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>T. tenax</i>	<i>Thermoproteus tenax</i>
<i>V. harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
1,3 dPG	1,3-diposphoglycér ate
2PDS	2,2'-dithiodipyridine
3 PGA	acide 3-phosphoglycéri que
4-HNE	4-hydroxynoné nal
6PG	6-phosphoglu conate
11-oxo- Δ^8 -THC	11-oxo-Δ^8-tétrahydrocannab inol
AC	adénylate cy clase
ADH	alcool déshydrogéné se
ADN	acide déoxyribo nucléique
ADR	aldéhyde réductase
ALDH	aldéhyde déshydrogéné se
AKR	aldo-céto réduct ases
Amp	ampicill ine
AO	aldéhyde oxyd ases
AR	aldose réduct ase
ASADH	aspartate- β -semialdéhyde déshydrogéné se
ATP	adénosine triphosph ate
ADP	adénosine diphosph ate
AMP	adénosine monophosph ate
CoA	coenz yme A
Da, kDa	dalton, kilodalton
db	double brin
DHN	dihydroxynoné ne
dNTP	déoxynucléotide triphosph ate
ddNTP	2',3'- didéoxynucléotide triphosph ate
DMSO	diméthylsulfoxyd e
DO	densité opti que
DTNB	acide dithionitrobenzoï que
DTT	dithiotréit ol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacéti que
FAD	flavine adénine dinucléoti de
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
G3P	glycéraldéhyde-3- phosph ate
G6P	glucose- 6-phosph ate
G6PD	glucose- 6-phosph ate déshydrogéné se
GABA	acide γ - amino butyri que
GAPDH	glycéraldéhyde-3- phosph ate déshydrogéné se
GAPN	glycéraldéhyde-3- phosph ate déshydrogéné se non-phosphorylante
GHB	acide γ - hydroxybutyri que
GP	gluthation peroxyd ase

GR	gluthation réductase
GST	gluthation- S -transférase
HNA	2- hydroxy -1- naphtaldéhyde
HNC	acide 2- hydroxy -1- naphtoïque
k_{cat}	constante catalytique
k_{obs}	constante de vitesse observée
KDPG	2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate
K_I	constante d'inhibition
K_M	constante de Michaelis
KPi	phosphate de potassium
LB	Luria Broth
MES	acide-2(- N-morpholino)éthanesulfonique
MDA	malondialdéhyde
MSDH	méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase
μ l, ml, l	microlitre, millilitre, litre
μ M, mM, M	micromolaire, millimolaire , molaire
NaAc	acétate de sodium
NAD(P)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) , forme oxydée
NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) , forme réduite
NMN(H)	nicotinamide mononucléotide oxydé (réduit)
nm, μ m	nanomètre , micromètre
P5C	Δ 1- pyrroline-5-carboxylate
pb	paire de bases
PEG	polyéthylène glycol
Pi	phosphate inorganique
POX	proline oxydase
qsp	quantité suffisante pour
RALDH	rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	récepteur à acide rétinoïque
RARE	élément de réponse à l'acide rétinoïque
RMN	résonance magnétique nucléaire
RXR	récepteur à rétinoïdes
s, min, h	seconde, minute, heure
SDS	dodécylsulfate de sodium
S.I.E	effet isotopique de solvant ("solvant isotope effect ")
SSADH	succinate semialdéhyde déshydrogénase
TES	acide <i>N</i> -[tris (hydroxyméthyl)méthyl]-2-amino-éthanesulfonique
TNF- α	facteur de nécrose tumorale α
Tris	tris (hydroxyméthyl)aminométhane
UV	ultra-violet

Avant-propos

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDH) non-phosphorylantes à cofacteur NAD(P), coenzyme A (CoA) dépendantes ou non, forment une famille d'enzymes phylogénétiquement et structuralement distincte des ALDH phosphorylantes. Elles jouent un rôle essentiel au niveau cellulaire en intervenant notamment à différents niveaux du métabolisme cellulaire et dans des processus de détoxification. Ces enzymes catalysent l'oxydation d'une large variété de substrats aldéhydiques en leur acide correspondant par un mécanisme à deux étapes, une étape d'oxydo-réduction conduisant à la formation d'un intermédiaire thioacylenzyme et de NAD(P)H, suivie de la rupture de la liaison thioester par attaque nucléophile d'une molécule d'eau ou de CoA.

Stéphane Marchal avait initié une étude de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante (GAPN), non CoA-dépendante, de *Streptococcus mutans*, enzyme impliquée dans la production d'équivalents réducteurs nécessaires au métabolisme de la bactérie. Il avait caractérisé les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la catalyse, principalement au niveau de l'étape d'acylation, et la spécificité structurale de la GAPN de *S. mutans*. En particulier, il avait montré le rôle essentiel des réarrangements conformationnels associés aux diverses étapes de la catalyse.

Mon projet de recherche s'inscrit dans ce cadre et avait pour premier objectif de caractériser 1) les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la stabilisation et le positionnement du nicotinamide du cofacteur NADP au cours de l'étape d'acylation et, 2) la conformation adoptée par le NADPH après le transfert d'hydrure. Les deux autres objectifs avaient trait à la caractérisation des facteurs moléculaires et structuraux impliqués 1) dans l'activation et le positionnement efficace du résidu E268 dont le rôle crucial dans l'étape d'hydrolyse avait été montré et, 2) dans les phénomènes de coopérativité et de réactivité de demi-site.

Mon mémoire commencera par une Introduction décrivant les propriétés générales des ALDH tant au niveau biochimique que structural. La partie "Résultats" est présentée en deux chapitres en partie sous forme de publications. Le premier est consacré à l'étude des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la stabilisation et l'isomérisation du cofacteur au cours de la catalyse. Le second chapitre concerne l'étude du site de désacylation de GAPN et une étude préliminaire des propriétés de coopérativité. Cette partie "Résultats" est suivie d'une partie "Discussion-Perspectives". Enfin, une partie "Matériel & Méthodes" mentionne les protocoles et techniques utilisés qui ne sont pas décrits dans les publications.

Etude bibliographique

Les aldéhydes, qui sont des molécules ubiquitaires dans notre environnement, dérivent *in vivo* de la biotransformation d'un grand nombre de composés endogènes ou exogènes (Lindahl, 1992). Ils présentent un spectre très large de structures chimiques et interviennent dans de nombreux processus cellulaires. Le caractère électrophile de leur groupement carbonyle leur confère une grande réactivité qui peut s'avérer toxique. *In vivo*, l'élimination sélective de la majorité des aldéhydes se révèle essentielle pour le maintien des fonctions vitales, d'où l'existence de voies de détoxification.

1. Les aldéhydes : des composés aux effets biologiques antagonistes

1.1. Implication dans les processus physiologiques

Les aldéhydes sont des composés essentiels du métabolisme cellulaire. Ils représentent des intermédiaires clés aussi bien dans les voies anaboliques que dans les voies cataboliques. C'est le cas par exemple, du méthylmalonate qui provient du catabolisme de la valine ou de l'acétaldéhyde issu de la fermentation alcoolique. A titre d'exemple et en relation avec mon projet de thèse, deux exemples seront développés : le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le rétinaldéhyde.

1.1.1. Le glycéraldéhyde-3-phosphate

Le G3P est un composé central du métabolisme cellulaire. Il intervient aussi bien dans le catabolisme, essentiellement dans les différentes voies de dégradation du glucose, que dans l'anabolisme. C'est d'abord un intermédiaire clé de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas). En effet, la fructose-1,6-biphosphate aldolase transforme le fructose-1,6-biphosphate en G3P et dihydroxyacétone phosphate. Ce dernier est ensuite converti en G3P par la triose phosphate isomérase. Le G3P est ensuite oxydé par différents systèmes enzymatiques. Chez les archaées, c'est une voie d'Embden-Meyerhof modifiée qui est utilisée, alors que chez les eucaryotes et la plupart des bactéries, c'est la voie classique qui est utilisée (Siebers et Schönheit, 2005) (Schéma 1). Le G3P intervient également dans la voie des pentoses phosphates. Cette voie conduit à l'oxydation rapide de métabolites en conditions aérobies, permettant ainsi de nombreuses biosynthèses. Enfin, le G3P est impliqué dans la voie d'Etners-

Doudoroff. Dans cette voie, soit du pyruvate est directement formé, soit le G3P produit est transformé en pyruvate *via* la glycolyse. Ceci permet ainsi une interconnexion entre ces deux voies. Il est à noter que chez les archaées, il existe différentes variantes de la voie d'Etner-Doudoroff en fonction du type d'archaées, le G3P restant dans tous les cas un intermédiaire obligé (Sakuraba et Ohshima, 2002). Le G3P est également impliqué dans les voies anaboliques au niveau de la néoglucogénèse (Siebers et Schönheit, 2005), mais aussi dans la voie de biosynthèse du tryptophane (Payne *et al.*, 1987). Il intervient aussi dans l'export d'équivalents réducteurs sous forme NADPH produits lors de la photosynthèse dans le stroma du chloroplaste vers le cytosol, où le pouvoir réducteur se retrouve sous forme NAD(P)H (Fliege *et al.*, 1978). Ce transport ATP-dépendant se fait *via* le transporteur à phosphate de la membrane interne du chloroplaste. Dans le règne végétal, le G3P est également utilisé dans la voie de stockage d'énergie sous forme d'amidon. Enfin, de récentes études ont montré que le G3P pouvait former du glyoxal *via* la réaction de Fenton. Ce glyoxal provoque des réponses cytotoxiques et génotoxiques incluant l'apoptose et l'arrêt de la croissance cellulaire. La mise en évidence de glyoxal à partir de G3P permet de mieux comprendre le lien qui existe entre stress oxydant et altération du métabolisme des trioses (Manini *et al.*, 2006).

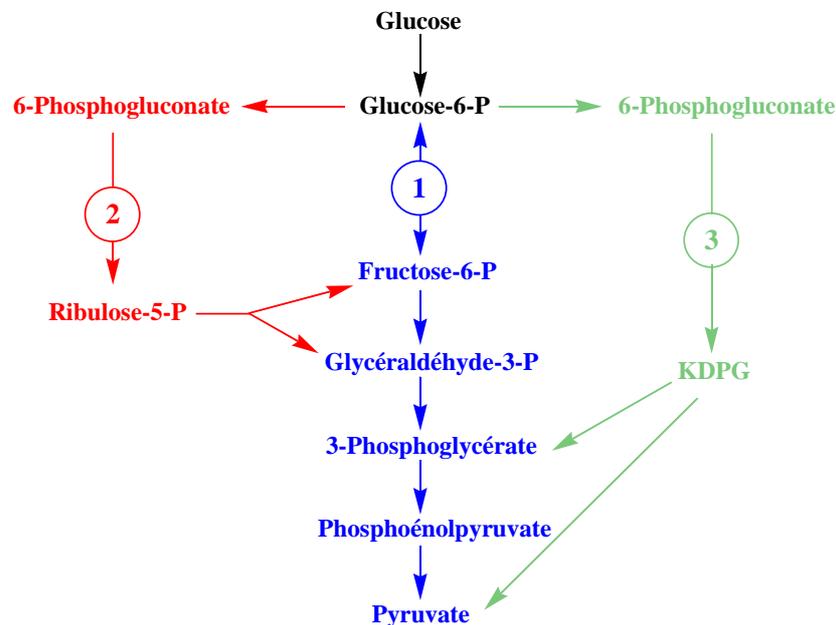


Schéma 1 : Les trois principales voies de dégradation du glucose.

La voie 1 (en bleu) correspond à la glycolyse, également appelée voie d'Embden-Meyerhof, la voie 2 (en rouge) correspond à la voie des pentoses phosphates et la voie 3 (en vert) à la voie du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG) dite d'Etner-Doudoroff (d'après Leclerc *et al.*, 1995).

1.1.2. Le rétinaldéhyde

Le rétinal est un composé essentiel au niveau de la vision et du développement embryonnaire. Il est généré à partir du β -carotène (provitamine A) et du rétinol (vitamine A). Au niveau de la vision, ce sont les propriétés optiques de l'isomère *tout-trans*, issu de l'isomérisation de l'isomère *11-cis*, qui sont utilisées. Au niveau développement embryonnaire, c'est notamment les isomères *tout-trans* et *9-cis* qui sont impliqués (Duester, 2000). En effet, des études ont montré que l'oxydation du rétinaldéhyde en acide rétinoïque est essentielle à la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes pendant le développement de l'embryon et chez l'adulte (Napoli, 1999). Il intervient également dans la différenciation sexuelle lors de la vie de l'embryon (Maly *et al.*, 2003). En effet, les rétinoïdes se fixent sur des récepteurs spécifiques, les RAR et RXR (Retinoïc Acid Receptor, Retinoïds X Receptor). Ces récepteurs doivent s'associer en hétérodimère RAR/RXR pour être fonctionnels et fixer les rétinoïdes (Napoli, 1999 ; Duester, 2000). Une fois les complexes récepteurs (RAR/RXR) – ligand (rétinoïdes) formés, ils se fixent alors sur des régions régulatrices de certains gènes tels que les gènes *homeobox* pour activer leur transcription (Greene *et al.*, 1998). Ces régions régulatrices sont appelées RARE pour Retinoïc Acid Response Element (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004). D'autres études ont montré qu'une dérégulation de la quantité de rétinoïdes peut s'avérer cytotoxique et tératogène avec des effets variés allant de la troncation ou l'absence de membres jusqu'à la mort de l'embryon avant le terme de son développement (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004 ; Napoli, 1999). De même, certains gènes, activés par les rétinoïdes, permettent l'entrée en apoptose de la cellule. Enfin, il a été montré que les rétinoïdes peuvent être utilisés pour traiter certaines pathologies telles que l'acné ou certains cancers, notamment dans les cas de mélanomes liés au diabète (Lin *et al.*, 2003).

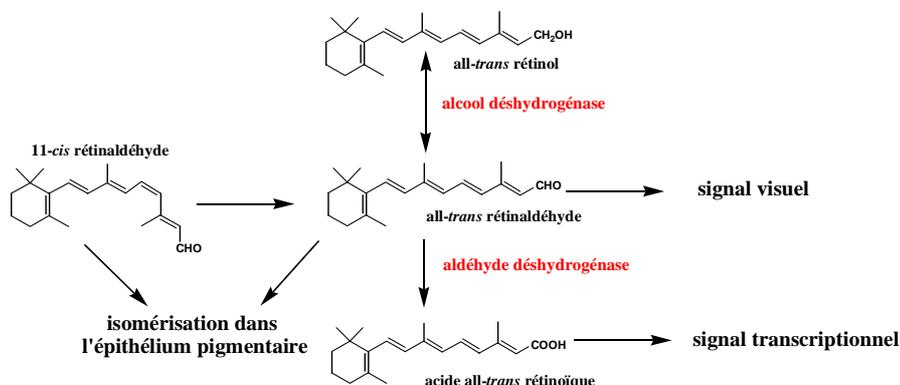


Figure 1 : Rôles du rétinaldéhyde et de certains de ses dérivés dans les différentes fonctions biologiques chez les vertébrés (d'après Napoli, 1999).

1.2. Effets toxiques

Le caractère électrophile de la fonction aldéhyde confère aux composés carbonylés une grande réactivité. Celle-ci est mise à profit par la cellule dans les voies métaboliques. Cependant, cette forte réactivité rend ces molécules potentiellement toxiques pour les cellules. En effet, ces aldéhydes peuvent former des adduits covalents avec de nombreuses biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides). Ces adduits peuvent alors être à l'origine de dysfonctionnements cellulaires. C'est ainsi que de nombreux aldéhydes, issus de la biotransformation de substances endogènes (acroléine, etc.) ou exogènes (le cyclophosphamide utilisé dans le traitement anticancéreux, etc.) sont impliqués dans diverses pathologies telles que des cancers ou d'autres maladies (diabète, athérosclérose, maladies cardiovasculaires, etc.). Il existe un large spectre de composés portant une fonction aldéhyde, cette fonction chimique, de par sa réactivité pouvant s'avérer toxique pour les cellules. Dans un souci de concision, je ne détaillerai que deux exemples, l'acétaldéhyde, notamment issu du métabolisme de l'éthanol, et les aldéhydes générés lors de la peroxydation des lipides.

1.2.1. Alcoolisme et toxicité cellulaire : rôle de l'acétaldéhyde

Au niveau du foie, trois systèmes enzymatiques différents catalysent l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde qui est ensuite rapidement transformé en acétate (Lieber, 1997). Cet acétate sera ensuite utilisé dans le métabolisme, essentiellement au niveau des tissus extra hépatiques (Figure 2). Cependant, une consommation importante et régulière d'alcool peut entraîner une accumulation d'acétaldéhyde qui est dangereuse pour la cellule. D'abord, il peut former des adduits avec les protéines *via* la formation de bases de Schiff avec les résidus lysine entraînant une modification voire une perte de leur(s) fonction(s). Il peut également conduire à une augmentation de la peroxydation des lipides par un accroissement de la quantité de radicaux libres dans la cellule dû à une baisse de la concentration en agents anti-oxydants (Amanvermez *et al.*, 2005). La production d'acétaldéhyde a également des conséquences indirectes. En effet, la production d'acétaldéhyde s'accompagne d'une production de NADH conduisant ainsi à une augmentation du rapport NADH/NAD. Ceci entraîne une hyperlactacidémie et un excès d'acide urique qui peut provoquer des crises de goutte (inflammation articulaire provoquée par une accumulation d'acide urique cristallisé dans les articulations) (Lieber, 1997). Cette augmentation du rapport NADH/NAD peut également provoquer un état d'hypoglycémie par inhibition de la gluconéogenèse (Lieber,

1997). De plus, la production d'acétaldéhyde peut inhiber l'élimination des composés dérivés de l'acide barbiturique, ce qui peut avoir des conséquences létales pour l'organisme. Enfin, l'acétaldéhyde peut jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire en induisant la synthèse d'une cytokine, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), ce qui provoque l'apoptose de la cellule (Hsiang *et al.*, 2005).

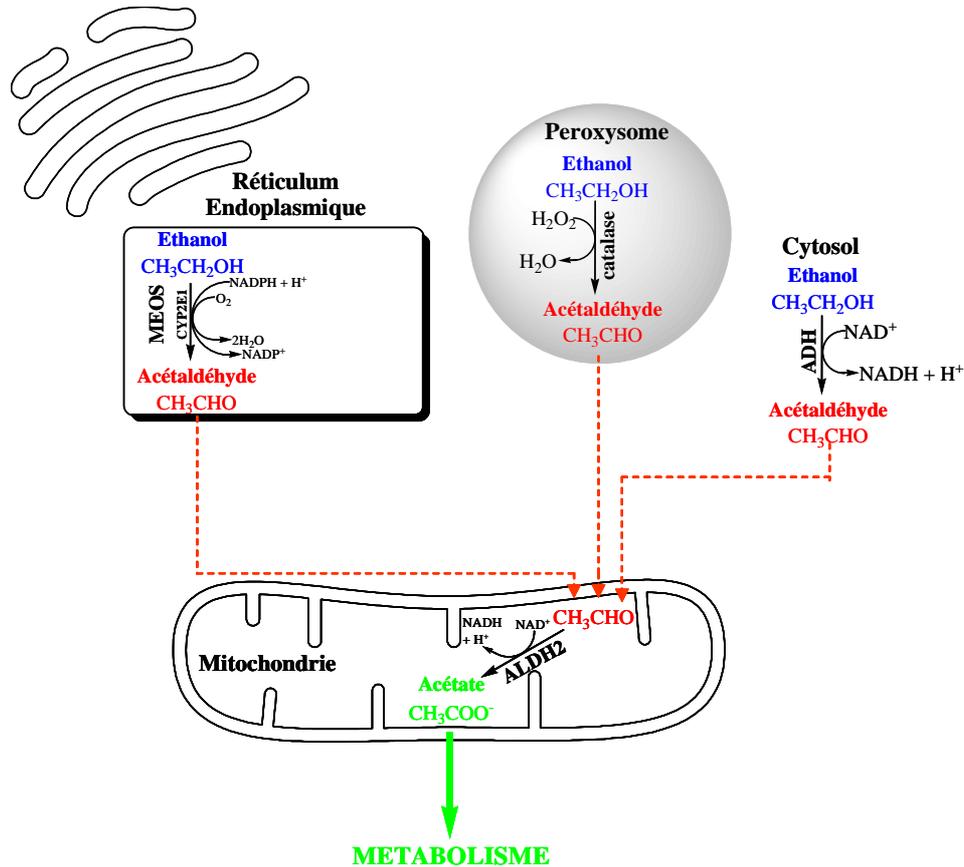


Figure 2 : Métabolisme de l'éthanol dans les cellules hépatiques (d'après Salway, 1999).

Abbréviations : ADH : alcool déshydrogénase, ALDH2 : aldéhyde déshydrogénase de classe 2, MEOS : système microsomal d'oxydation de l'éthanol, CYP2E1 : cytochrome P₄₅₀ 2E1.

1.2.2. Aldéhydes générés lors de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est un processus biologique bien connu associé à différents stress cellulaires (absorption d'alcool, exposition aux radiations UV, à certains cations divalents, aux radicaux libres, augmentation de la concentration intra cellulaire en hydrate de chlore) subis par une cellule, notamment lors du vieillissement. Ce phénomène donne lieu à la formation de produits d'oxydation qui rendent les bicouches lipidiques plus hydrophiles, entraînant ainsi des perturbations dans la microarchitecture membranaire et une

altération de la fonction des enzymes et des transporteurs de ces membranes. Parmi ces composés, sont notamment retrouvés des aldéhydes α,β -insaturés, qui sont des produits de scission des acides gras ω -6 insaturés (Pappa *et al.*, 2003a). Ces composés sont chimiquement plus stables que leurs précurseurs, les radicaux libres, et peuvent diffuser au sein ou à l'extérieur de la cellule pour modifier d'autres cibles éloignées du site initial de la réaction de peroxydation (Sunkar *et al.*, 2003). Le caractère électrophile de ces composés leur confère une grande réactivité vis-à-vis d'une large gamme de molécules telles que les protéines, *via* une addition de Michaël sur les résidus lysine, histidine ou cystéine, ou sur les acides nucléiques pour former des adduits qui vont altérer le fonctionnement cellulaire. Par exemple, ces aldéhydes inhibent la fonction du protéasome 26S en le modifiant ou en empêchant la reconnaissance de protéines destinées à la dégradation (Pappa *et al.*, 2003a). Le produit principal de la peroxydation des lipides est le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ce composé dérive de l'acide linoléique (Davydov *et al.*, 2004). Ses adduits dérèglent le fonctionnement cellulaire et induisent l'apoptose (Davydov *et al.*, 2004). Le 4-HNE a également été montré être impliqué dans diverses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou l'athérosclérose (Figure 3). Le malondialdéhyde (MDA) est également un produit de la peroxydation des lipides, mais il peut aussi être généré par voie enzymatique à partir de différentes prostaglandines (Del Rio *et al.*, 2005). Le MDA forme de nombreux adduits avec l'ADN, et notamment avec la guanosine conduisant à des mutations. Celles-ci peuvent conduire à des processus de cancérisation. Ces adduits peuvent également altérer la structure en double hélice de l'ADN et conduire à sa cassure (Del Rio *et al.*, 2005). Au niveau des protéines, le MDA peut ponter les fibres de collagène amenant une perte de flexibilité des tissus cardiovasculaires. Enfin, il joue également un rôle athérogène en modifiant l'interaction entre les lipoprotéines et les macrophages (Del Rio *et al.*, 2005).

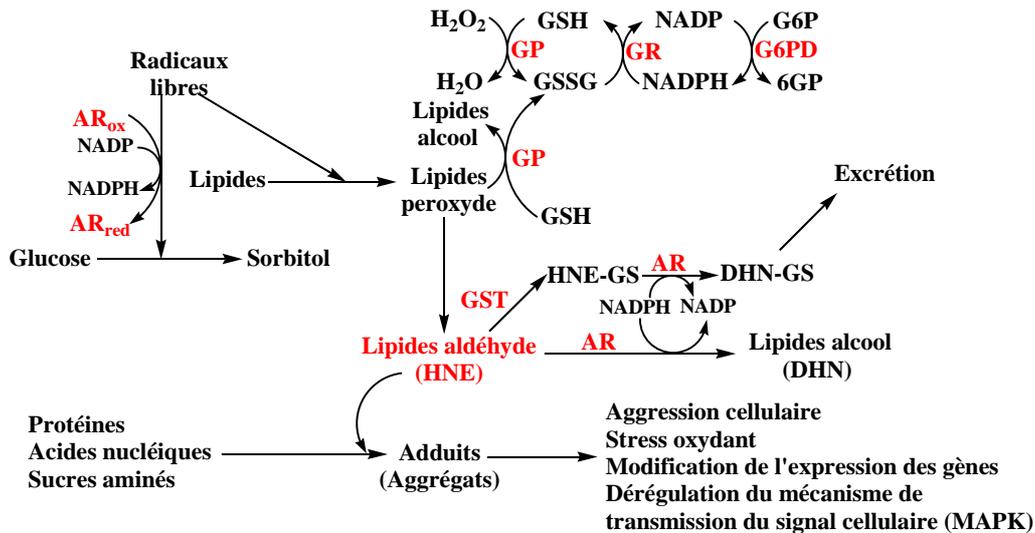


Figure 3 : Mécanisme proposé du rôle des peroxydes de lipides dans le dysfonctionnement cellulaire (d'après Ansari *et al.*, 1996)

Abbréviations : HNE : 4-hydroxynonéal, DHN : dihydroxynonène, G6P : glucose-6-phosphate, 6PG : 6-phosphogluconate, GP : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase, AR : aldose réductase

2. Systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des aldéhydes

2.1. Les monooxygénases P450

Les monooxygénases P450, autrement appelées cytochromes P450, constituent une vaste superfamille d'hémoprotéines utilisant l'oxygène moléculaire pour catalyser différentes réactions telles que les époxydations, les N-désalkylations, les S-oxydations et les hydroxylations (Chang et Kam, 1999). Ces enzymes sont retrouvées dans tous les règnes : bactéries, archae, eucaryotes (champignons, plantes, animaux supérieurs). Il existe deux grandes familles de cytochromes P450 en fonction de leur localisation subcellulaire : 1) les enzymes microsomales, qui sont des protéines membranaires appartenant à la membrane du réticulum endoplasmique et dont le rôle majeur est la détoxification des xénobiotiques et le catabolisme de certains composés endogènes et ; 2) les enzymes mitochondriales, qui sont intégrées dans la membrane interne des mitochondries. Ces dernières sont impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Ces deux groupes de cytochromes P450 utilisent des chaînes de transfert d'électrons différentes. Dans le cas des enzymes microsomales, la chaîne de transfert comprend la NADPH réductase qui possède deux centres flaviniques (Flavine Adénine Dinucléotide et Flavine Mono Nucléotide). Deux électrons sont transférés du

NADPH à sa réductase, cette dernière transférant ensuite ces deux électrons un par un au cytochrome P450. Les enzymes mitochondriales utilisent le système adrénoxine/adrénoxine réductase. L'adrénoxine réductase transfère deux électrons du NADPH vers l'adrénoxine. Le cytochrome P450 est l'accepteur final de ces électrons. Depuis 1996, Nebert et son équipe ont mis en place une nomenclature basée sur les identités de séquence des différents cytochromes P450. Chaque protéine se voit attribuer le préfixe CYP suivi d'un chiffre arabe pour la famille, une lettre pour la sous-famille et un nombre pour la protéine elle-même. Par exemple, CYP2E1 correspond à la protéine 1 de la sous-famille E, elle-même appartenant à la famille 2 des cytochromes P450. Ces enzymes ont différents rôles physiologiques. Cependant, elles suivent toujours le même principe général en transformant des molécules, notamment lorsque celles-ci peuvent s'avérer toxique pour les cellules (drogues, alcools, solvants organiques, agents anesthésiants, polluants environnementaux et chimiques, colorants), afin de les rendre plus hydrophiles. Celles-ci seront ensuite soit métabolisées, soit excrétées à l'extérieur de la cellule en vue de leur élimination, soit conjuguées à d'autres composés (type glutathion) par voie enzymatique dans un même but d'élimination. Ceci se fait en deux étapes à l'aide d'un donneur d'électrons. Dans une première étape, appelée phase I, il y a oxydation du composé par un CYP. Ensuite, lors de la phase II, soit le composé est excrété, soit il est pris en charge par un autre système enzymatique pour être transformé. Le grand nombre de réactions catalysées par les CYP impose à cette superfamille d'enzymes une spécificité de substrat très large (Chang et Kam, 1999). En effet, ces enzymes catalysent la transformation d'un large spectre de composés allant des stéroïdes aux acides gras en passant par les alcanes, alcènes et autres composés aromatiques, hétérocycliques ou non. Il est à noter que l'oxydation des aldéhydes est une propriété commune à tous les cytochromes P450. Par exemple, le Δ^8 -THC, composé psychoactif de la marijuana est oxydé en 11-oxo- Δ^8 -tétrahydrocannabinol (11-oxo- Δ^8 -THC). Le 11-oxo- Δ^8 -THC est ensuite oxydé dans les microsomes en acide carboxylique correspondant par des enzymes portant une activité MALDO (Microsome ALDéhyde Oxygénase). Cette activité enzymatique est assurée par les protéines CYP2C9 et 3A4 dans le foie humain (Watanabe *et al.*, 2002). Les cytochromes P450 ont également d'autres rôles. Par exemple, ils interviennent dans le processus de peroxydation des lipides, en générant des espèces réactives de l'oxygène. Ces entités produisent elles-mêmes des aldéhydes comme le 4-HNE (Bardag-Gorce *et al.*, 2005). Parmi les nombreuses fonctions assurées par ces enzymes, nous retrouvons encore un rôle dans le cycle cellulaire puisque cette famille protéique agit indirectement sur la régulation du signal d'apoptose. En effet, l'éthanol est

converti en acétaldéhyde par le CYP2E1. Cet aldéhyde entraîne l'activation de NFκ-B qui lui-même active la transcription du gène codant la cytokine TNF-α provoquant ainsi l'apoptose (Cao *et al.*, 2002). En ce qui concerne le mécanisme catalytique de ces enzymes, le Fer, à l'état d'oxydation III, est lié par quatre liaisons covalentes à la porphyrine de l'hème. La cinquième liaison de coordination est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine du site catalytique. Enfin, la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau ou l'oxygène moléculaire. La fixation du substrat libère la molécule d'eau. Le fer fixe alors un électron et passe à l'état Fe^{II} . Ensuite, l'oxygène moléculaire O_2 devient le sixième ligand du fer qui repasse à l'état Fe^{III} . La fixation successive d'un électron et de deux protons permet d'obtenir le fer à l'état Fe^{V} et la libération d'une molécule d'eau. Le substrat se lie alors avec l'oxygène coordonné au fer passé à l'état Fe^{III} . Enfin, l'hydrolyse de ce complexe permet la libération du produit hydroxylé (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

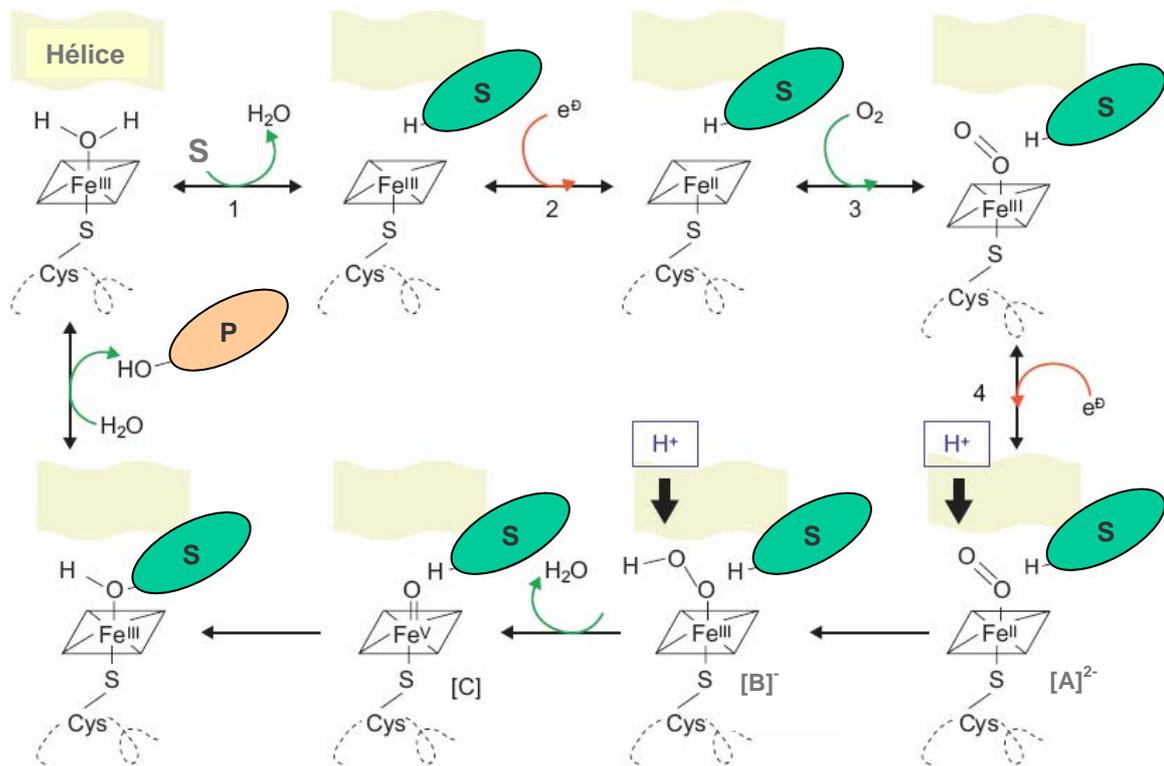


Schéma 2 : Mécanisme catalytique général des cytochromes P450 (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000)

Ces monooxygénases catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène de l'oxygène moléculaire sur le substrat, le second oxygène étant réduit sous forme H_2O . La réaction la plus fréquente est une hydroxylation en utilisant un intermédiaire fer-oxo très réactif et électrophile ([C]). La forme hydroperoxo de l'enzyme ([B]) est aussi un oxydant électrophile qui catalyse l'insertion de " OH^+ ". L'attaque nucléophile peut être catalysée par les espèces $[\text{A}]^{2-}$ et [B]⁻; la réduction, l'isomérisation ou la déshydratation sont catalysées par les formes sans oxygène de l'enzyme. S représente le substrat et P le produit.

2.2. Les aldo-céto réductases (AKR)

Les AKR constituent une superfamille d'oxydoréductases à cofacteur NAD(P)(H) impliquées dans la biotransformation de nombreux composés tels que les aldéhydes aliphatiques et aromatiques, les oses aromatiques ou polycycliques, les stéroïdes, les prostaglandines, les phytoalexines isoflavinoïdes et certains xénobiotés (Jez *et al.*, 1997). Ces protéines présentent toutes le même repliement de type tonneau- $(\alpha,\beta)_8$. La plupart de ces enzymes sont monomériques et présentent une tétrade catalytique (Asp50, Lys84, Tyr55 et His117). Dans l'enzyme d'origine humaine, le monomère est constitué d'environ 320 résidus, alors que chez le rat ou la souris, les monomères sont constitués d'environ 360 résidus (Matsunaga *et al.*, 2006). La spécificité de substrat est déterminée par la présence d'une boucle présente à l'extrémité C-terminale du tonneau- $(\alpha,\beta)_8$ (Hyndman *et al.*, 2003). Les AKR comprennent plusieurs familles d'enzymes. Les aldéhyde réductases (ADR), qui catalysent la réduction d'une large gamme d'aldéhydes issus de la peroxydation des lipides, constituent une première famille. Elles sont réparties de manière ubiquitaire dans les tissus, mais avec de fortes concentrations dans le cortex du rein, le foie et la glande thyroïde. Ces ADR sont impliquées dans la détoxification d'aldéhydes biogéniques ou de xénobiotés qui peuvent modifier des macromolécules cellulaires telles que des protéines ou des acides nucléiques. Elles catalysent notamment la réduction de méthylglyoxal, du 4-hydroxynonéal et de dérivés d'oxydation d'oses. Les aldose réductases (AR) constituent une deuxième famille des AKR. Ces enzymes catalysent la réduction d'aldohexoses et de certains aldéhydes aromatiques, α,β -insaturés (acroléine, 4-hydroxynonéal s'il est conjugué au glutathion) ou hydrophiles, dans ce dernier cas le carbone en α devant être oxydé (glycoaldéhyde). Ces enzymes sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que l'osmorégulation, le métabolisme du glucose (Jez *et al.*, 1997) et des aldéhydes dérivés de la peroxydation des lipides. Les AR jouent également un rôle lors de stress oxydants. De plus, ces enzymes sont présentes en grandes quantités dans les organes insulinodépendants tels que le coeur et les muscles squelettiques et sont impliquées dans différentes pathologies. Par exemple, elles jouent un rôle important dans les rétinopathies du cristallin observées chez les personnes touchées par un diabète de type II (Chang *et al.*, 2003). En effet, les AR interviennent dans la voie des polyols lors de la première étape, qui est limitante, en catalysant la conversion du glucose en sorbitol, mais elles assurent également la transformation du galactose en galactitol. Lors d'un état d'hyperglycémie, il y a accumulation de sorbitol et de galactitol dans le cristallin. Ceci a pour conséquence une augmentation de la pression osmotique. Le cristallin

devient alors opaque. Cela peut entraîner des pathologies de type cataracte et aller jusqu'à la cécité (Banditelli *et al.*, 1999). Les AR sont d'ailleurs aujourd'hui considérées comme des cibles thérapeutiques dans le traitement des complications dues à un diabète. Les hydroxystéroïde déshydrogénases constituent une troisième famille d'enzymes. Elles jouent un rôle dans les voies de signalisation par les hormones stéroïdiennes en les transformant en métabolites inactifs, les empêchant ainsi de se fixer sur leurs récepteurs (Schlegel *et al.*, 1998). Enfin, les dihydrodiol déshydrogénases constituent une autre famille des AKR. Elles jouent un rôle important dans le phénomène de cancérisation de certaines cellules. Par exemple, ces enzymes convertissent les dihydrodiols issus de la biotransformation d'hydrocarbures aromatiques et polycycliques venant de pollutions diverses (tabac, atmosphère) en catéchols. Ces catéchols sont convertis par autooxydation en O-quinones qui provoquent des dommages sur l'ADN (Seike *et al.*, 2004). Ces dommages peuvent alors entraîner des cancers au niveau du foie, du poumon, de la peau et de la prostate. Ces dihydrodiol déshydrogénases sont également impliquées dans la résistance au traitement de cancers par chimiothérapie utilisant le cisplatine et dans l'aggravation de la maladie dans le cas du cancer de l'ovaire (Chen *et al.*, 2005).

Le mécanisme catalytique des différentes enzymes de cette famille est commun. Il implique le transfert stéréospécifique d'un hydrure pro-*R* du C4 du cycle pyridinium du cofacteur vers la face β du stéroïde. Dans ce mécanisme, le résidu Tyr55 joue le rôle de catalyseur acide général en cédant un proton au groupement carbonyle pour former une fonction alcool (Seike *et al.*, 2004) comme le montre le schéma 3. Cependant, un autre mécanisme a été proposé par Lee *et al.* (1998), où le donneur de proton serait plutôt le résidu His117 et où ce même acide aminé, ainsi que le résidu Tyr55, interviendrait dans le positionnement du substrat *via* un ensemble de résidus formant des interactions électrostatiques.

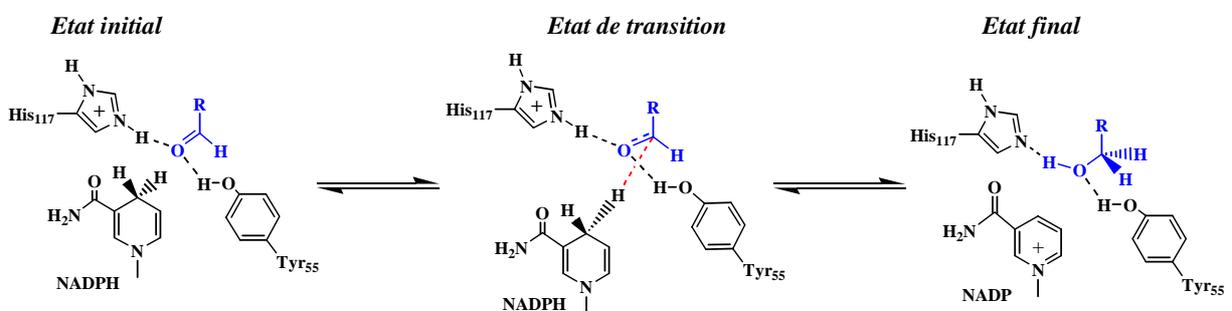


Schéma 3 : Mécanisme de réduction du D-glycéraldéhyde en glycérol par l'aldose réductase.

La fonction carbonyle est stabilisée par interactions de type liaison hydrogène avec la chaîne latérale des résidus His117 et Tyr55. Après le transfert de l'hydrure sur le carbocation, le résidu His117 joue le rôle de catalyseur acide (*d'après* Lee *et al.*, 1998). R=CH₂OH-CH₂OH.

En 1996, les aldo-céto réductases ont été classées selon une nomenclature systématique mise en place par T.M. Penning et son équipe. Cette nomenclature, qui peut être consultée sur le site internet www.med.upenn.edu/akr, classe les différentes AKR en familles et sous-familles en fonction du pourcentage d'identité de séquences. En 2003, 114 protéines étaient répertoriées en 14 familles réparties dans les trois règnes du vivant (Hyndman *et al.*, 2003).

2.3. Les aldéhyde oxydases à cofacteur molybdoptérine (AO)

Les aldéhyde oxydases (AO) à cofacteur molybdoptérine appartiennent à la super famille des molybdoflavoenzymes, qui comprend également les xanthine oxydoréductases, les nitrate réductases et les sulfite réductases (Garattini *et al.*, 2003). Les AO, qui sont des enzymes ubiquitaires, sont homodimériques. Chaque monomère, de 150kDa environ, se compose d'une extrémité N-terminale de 20kDa qui possède deux centres Fe/S, d'un domaine central de 40kDa contenant le site de fixation de la flavine du cofacteur FAD et enfin d'un domaine C-terminal de 85kDa où se trouve le site de reconnaissance du molybdène et le site de fixation du substrat (Sekimoto *et al.*, 1997). Ces enzymes catalysent l'oxydation, en présence d'O₂, d'aldéhydes (acétaldéhyde, rétinol, etc.) et de composés azotés hétérocycliques (purines et dérivés, etc.). Les AO sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, elles jouent un rôle dans l'élimination de la phényléthylamine en oxydant le phénylacétaldéhyde en acide phénylacétique. Cette voie d'oxydation est importante puisque la phényléthylamine est une molécule responsable de migraines, et qui peut être toxique lorsqu'elle est retrouvée à forte concentration dans les aliments. La phényléthylamine peut aussi potentiellement activer la toxicité de l'histamine ou de la tyramine *via* les radicaux libres générés par les AO (Panoutsopoulos, 2005). Leur répartition tissulaire dépend de l'organisme où elles sont exprimées. Chez les mammifères, elles sont présentes en forte concentration dans les poumons et le foie car elles interviennent dans la détoxification de xénobiotiques et de polluants atmosphériques (Garattini *et al.*, 2003). Elles seraient également présentes à des concentrations plus faibles dans les testicules, les épithéliums kératinisés comme l'épiderme ou la muqueuse buccale, l'œsophage, la première partie de l'estomac, ainsi que dans le cerveau et la colonne vertébrale où elles seraient impliquées dans la biosynthèse de certains neurotransmetteurs (Garattini *et al.*, 2003). Elles sont également présentes dans les muqueuses olfactives puisqu'elles interviennent dans la régulation de la durée et de l'intensité des stimuli olfactifs en transformant les aldéhydes aliphatiques fortement odorants (Merlin *et al.*, 2005). Chez les plantes, les AO sont impliquées dans la biosynthèse d'auxines (hormones

végétales). En effet, le sirtinol est hydrolysé, par voie enzymatique ou non, pour donner le 2-hydroxy-1-naphtaldéhyde (HNA), ensuite oxydé en acide 2-hydroxy-1-naphtoïque (HNC) (Dai *et al.*, 2005). Chez les insectes, les AO sont exprimées dans les organes chimiosensibles. Etant impliquées dans la conversion d'aldéhydes odorants tels que des phéromones ou des particules volatiles de plantes, elles sont largement présentes dans les antennes au niveau des cils olfactifs. Elles sont aussi présentes mais en plus faible quantité dans les organes gustatifs tels que la trompe ou les pattes (Merlin *et al.*, 2005). Ces enzymes sont également supposées jouer un rôle dans la résistance aux insecticides chez certains insectes comme le moustique (Coleman *et al.*, 2002). Bien que l'implication dans le métabolisme de ces enzymes soit largement étudiée, aucune étude d'enzymologie approfondie n'a pour l'instant été réalisée. Le mécanisme catalytique n'a donc pas été élucidé, mais un mécanisme a été proposé sur la base des travaux menés sur la xanthine oxydoréductase bovine avec un substrat aldéhydique (Xia *et al.*, 1999). Le site de fixation du substrat forme un tunnel tapissé de résidus à caractère hydrophobe. L'identité de séquence observée avec les xanthine oxydoréductases (environ 50%) laisse penser que ces enzymes sont issues d'un même ancêtre et utilisent le même schéma réactionnel. L'oxydation de l'aldéhyde en son acide correspondant est initiée par une attaque nucléophile assistée par une base, le résidu invariant E1261, du groupement Mo-OH sur la fonction carbonyle du substrat avec un transfert d'hydrure concomitant sur le groupement Mo^(VI)=S pour donner Mo^(IV)-SH (Schéma 4). Dans une seconde phase, les électrons générés sont transférés vers un accepteur par le biais d'un transfert intramoléculaire du molybdène vers les centres Fe/S puis vers le FAD (Hille, 2005).

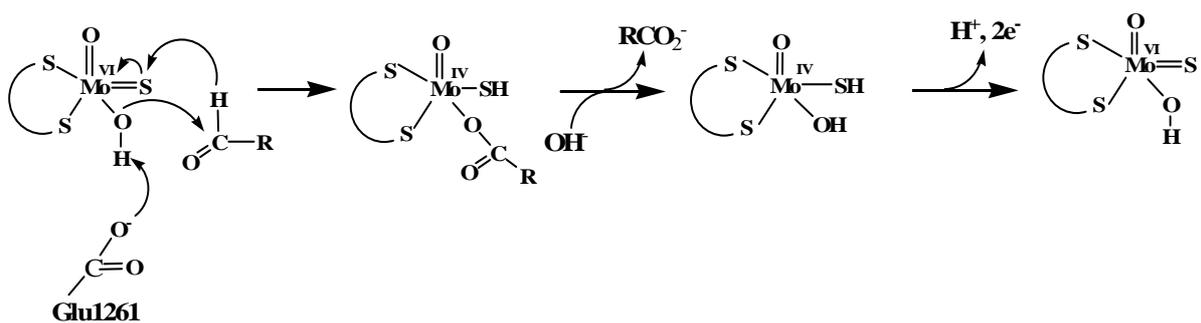


Schéma 4 : Mécanisme général des aldéhyde oxydases (*d'après* Hille, 2005).

Le processus de conversion d'aldéhydes en acides carboxyliques correspondants a été proposé *via* une attaque nucléophile, assistée par une base, du Mo-OH sur le substrat carbonylé, avec un transfert d'hydrure concomitant sur le Mo=S.

2.4. Les alcool déshydrogénases (ADH)

Ces enzymes sont des métalloenzymes qui fixent deux ions Zn^{2+} par monomère. Elles utilisent comme cofacteur le NAD. Ces enzymes sont, dans la plupart des cas homodimériques avec un monomère d'environ 40kDa. Chez la levure, ces enzymes sont retrouvées sous forme d'un homotétramère. Ces ADH sont regroupées en 6 classes selon leurs caractéristiques structurales et cinétiques. Cette nomenclature est disponible sur le site internet www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/ADH.shtml (Reimers *et al.*, 2004). Les ADH de classe I métabolisent l'éthanol et des alcools à courte chaîne alors que les ADH de classe II métabolisent des alcools ou des aldéhydes à chaîne carbonée plus longue et aromatique. Les ADH de classe III, encore appelées formaldéhyde déshydrogénases dépendantes du glutathion, métabolisent préférentiellement les alcools à longue chaîne et aromatiques. Elles n'interviennent pas dans le métabolisme de l'éthanol. Les ADH de classe IV métabolisent les rétinoïdes et peuvent également métaboliser l'éthanol. Enfin, peu d'informations concernant la fonctionnalité et la spécificité de substrat des ADH de classe V et VI sont disponibles (Reimers *et al.*, 2004). Cette brève description des différentes classes d'ADH montre que ces enzymes possèdent une large spécificité de substrat. Ces enzymes peuvent fonctionner dans le sens de l'oxydation mais également dans le sens de la réduction et ont des rôles physiologiques importants. Tout d'abord, certaines d'entre-elles sont impliquées dans l'élimination de l'alcool et de certains aldéhydes issus de l'alimentation au niveau du tractus digestif supérieur (Yin *et al.*, 2003). Au niveau de la cornée, des ADH interviennent dans la détoxification d'aldéhydes induits par les rayonnements ultraviolets (Yin *et al.*, 2003). Les ADH jouent également un rôle important dans le métabolisme des rétinoïdes car elles sont impliquées dans la synthèse d'acide rétinoïque à partir de rétinol. Cet acide rétinoïque est nécessaire au développement et à la régénération des tissus épithéliaux spécialisés et du système nerveux central. Notamment, l'ADH de classe IV est impliquée dans l'embryogenèse en catalysant l'oxydation des isomères *tout-trans* et *9-cis* du rétinol (Plapp *et al.*, 2001 ; Yin *et al.*, 2003). Cette activité est inhibée par les isomères *tout-trans* ou *13-cis* de l'acide rétinoïque (Allali-Hassani *et al.*, 1998). Elle est très présente dans les tissus épithéliaux, mais absente au niveau du foie. Dans l'embryon de souris, l'expression de l'ADH IV coïncide, au niveau spatiotemporel, avec celle de l'aldéhyde déshydrogénase de classe 1, mais également avec l'apparition des premières quantités d'acide rétinoïque (Allali-Hassani *et al.*, 1998). Enfin, les ADH jouent un rôle dans la signalisation des fonctions cognitives et de locomotion relayées par l'acide rétinoïque. Selon le substrat, le mécanisme cinétique peut être différent. C'est ainsi

que l'oxydation de l'éthanol se fait selon un mécanisme de type séquentiel ordonné ou *bibi ordonné* alors que la réaction couplée d'oxydation de l'éthanol et de réduction du 9-*cis* rétinol suit un mécanisme de type *ping-pong* (Plapp *et al.*, 2001). Enfin, l'activité rétinol déshydrogénase suit un mécanisme d'équilibre rapide avec un ou deux complexes ternaires abortifs (Yin *et al.*, 2003). Nous avons vu précédemment que les ADH possédaient deux ions Zn^{2+} . L'un d'eux joue un rôle structural. Il n'est cependant pas présent dans l'ADH de levure. L'autre a un rôle catalytique. Dans l'enzyme, après fixation du cofacteur et en absence de substrat, il est coordonné à deux cystéines, une histidine et une molécule d'eau sous forme hydroxyle (LeBrun *et al.*, 2004). Lorsque le substrat se fixe à l'enzyme, il déplace la molécule d'eau liée au zinc catalytique et devient le quatrième ligand. La déprotonation du substrat ou de la molécule d'eau est catalysée par un système relais *via* la sérine 48, la fonction hydroxyle en 2' du ribose du cofacteur et l'histidine 51 suivant le mécanisme décrit dans le schéma 5. La coordination du substrat au zinc catalytique facilite le transfert d'un ion hydrure du C1 du substrat vers le C4 du cycle pyridinium du cofacteur. L'aldéhyde formé est ensuite relargué suivi du cofacteur réduit. Certaines ADH ont la particularité d'oxyder les aldéhydes en acides (Shearer *et al.*, 1993). Cette réaction est possible car les aldéhydes en solution sont en équilibre avec la forme gem-diol qui mime une fonction alcool.

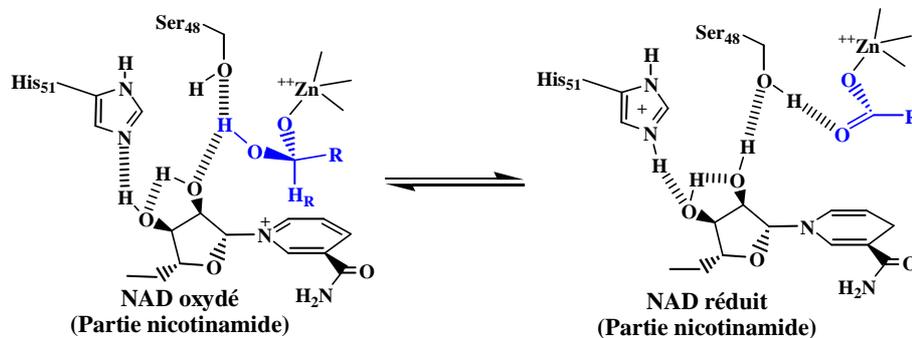


Schéma 5 : Oxydation du substrat aldéhyde sous forme gem-diol dans le site actif de l'alcool déshydrogénase de foie de cheval (Shearer *et al.*, 1993).

Le résidu His51 joue le rôle de base *via* un réseau de liaisons hydrogène, favorisant le transfert d'hydrure sur le noyau nicotinamidium du cofacteur NAD.

2.5. Les glutathion-S-transférases (GST)

Les GST représentent une famille d'enzymes multigéniques et multifonctionnelles qui sont présentes sous forme homo ou hétérodimériques. Ces enzymes utilisent comme substrats une large gamme de composés électrophiles tels que les aldéhydes pour les conjuguer au glutathion de façon à diminuer leur réactivité vis-à-vis des biomolécules. Cette conjugaison par le glutathion permet l'excrétion de ces composés, potentiellement toxiques, hors de la

cellule où ils seront éliminés. Les GST catalysent donc l'attaque nucléophile du glutathion sur ces molécules électrophiles. Cette attaque nécessite l'activation de la fonction thiol du glutathion qui se retrouve déprotonée *via* une interaction avec un résidu tyrosyl du site actif qui joue le rôle de catalyseur base (Rooseboom *et al.*, 2004). Ces enzymes sont réparties en différentes classes d'après les taux d'identité de séquences. Les enzymes cytosoliques sont réparties en cinq classes (classes α , μ , π , θ , et κ) et trois classes correspondent aux enzymes liées aux membranes des péroxysomes ou des mitochondries (classes σ , ω , ζ) (Strange *et al.*, 2001). Chez l'homme, ces enzymes sont abondantes dans le foie qu'elles protègent contre les effets des toxines. Une diminution des GST entraîne une nécrose cellulaire et aboutit plus généralement à la cancérisation de la cellule. Mais elles peuvent également être impliquées dans d'autres phénomènes de détoxication. En effet, les GST- π , lorsqu'elles se retrouvent sous forme de monomère, interagissent avec la protéine Jun N-terminal Kinase, qui devient inactive, et dont le rôle est de phosphoryler différents facteurs de transcription tels que c-jun (Strange *et al.*, 2001). Ceci permet d'assurer la survie de la cellule dans des conditions de stress oxydant. Ces enzymes peuvent également être impliquées dans certaines pathologies respiratoires telles que l'asthme. En effet, il existe un polymorphisme pour les allèles codant la protéine. Lorsque la protéine est homodimérique et que deux résidus valine sont présents dans le dimère en position 105, le risque d'avoir cette pathologie diminue significativement (Strange *et al.*, 2001). Cette classe est également impliquée dans la cancérisation des cellules basales cutanées (Strange *et al.*, 2001). Enfin, les GST- α présentent une forte activité peroxydasique vis-à-vis des peroxydes lipidiques et produits dérivés comme le 4-HNE et le MDA. La formation d'adduits entre ces GST- α et l'acétaldéhyde rend le foie plus vulnérable au stress oxydant induit par une consommation excessive d'alcool (Sultana et Butterfield, 2004).

3. Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDH) à cofacteur NAD(P) constituent une super famille d'enzymes dont le rôle physiologique est d'oxyder des substrats aldéhydiques de structure très variée en acides activés ou non. Ce sont des enzymes ubiquitaires. Cette superfamille comprend deux familles phylogénétiquement et structuralement distinctes à savoir d'une part les ALDH phosphorylantes et d'autre part, les ALDH non phosphorylantes Coenzyme A dépendantes ou non (Habenicht *et al.*, 1994 ; Michels *et al.*, 1994). Ces deux

familles présentent un mécanisme catalytique similaire à deux étapes. Dans une première étape, l'attaque d'une cystéine sur le groupement aldéhydique du substrat suivie par un processus d'oxydoréduction avec transfert d'hydrure vers le cofacteur donne lieu à la formation d'un intermédiaire thioacylenzyme. Cette première étape, dite d'acylation, est commune aux deux familles. Dans une deuxième étape, la liaison thioester est rompue par l'attaque nucléophile d'un accepteur d'acyle dont la nature diffère selon la famille d'ALDH. Pour les ALDH phosphorylantes, une molécule de phosphate inorganique joue le rôle d'accepteur d'acyle (Armstrong et Trentham, 1976). Dans le cas des ALDH non phosphorylantes Coenzyme A dépendantes, le coenzyme A joue ce rôle, alors que c'est une molécule d'eau qui assure cette fonction pour les enzymes non coenzyme A dépendantes (Schéma 6).

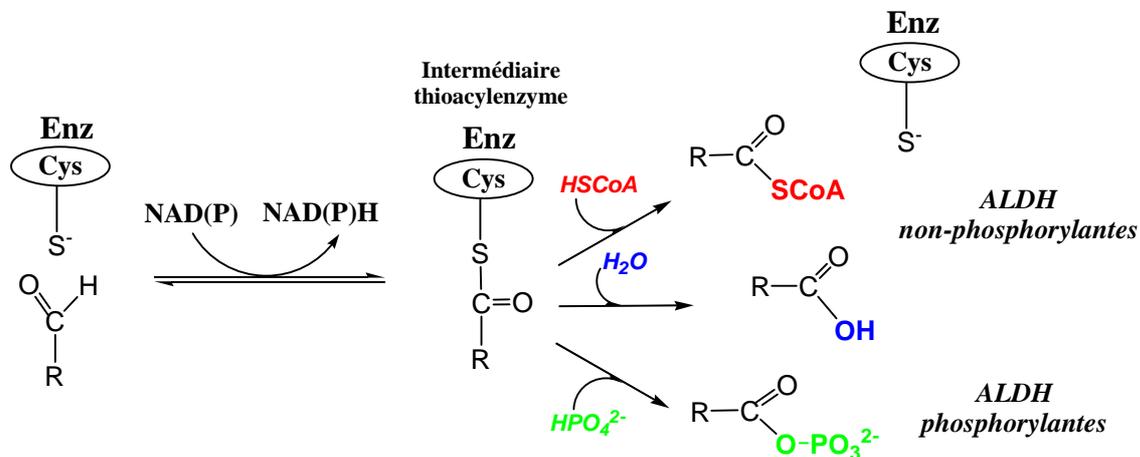


Schéma 6 : Schéma simplifié des réactions catalysées par les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P).

3.1. Rôles *in vivo* des ALDH

3.1.1. Les ALDH phosphorylantes

Cette famille d'ALDH est principalement impliquée dans les voies de biosynthèse et dans le métabolisme énergétique. C'est le cas de l'aspartate β -semialdéhyde déshydrogénase (E.C.1.2.1.11) qui intervient dans la voie de biosynthèse des acides aminés dérivés de l'acide aspartique et des glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases phosphorylantes (GAPDH). Ces dernières ont des rôles physiologiques qui peuvent être corrélés à leur spécificité de cofacteur. En effet, les GAPDH phosphorylantes NAD-dépendantes (E.C.1.2.1.12) sont principalement impliquées dans le catabolisme du glucose, *via* la voie de la glycolyse, en

oxydant le D-G3P en 1,3-diphosphoglycérate (1,3-dPG) (Harris et Waters, 1976). Par contre, les GAPDH phosphorylantes présentant une spécificité de cofacteur duale NAD(P) assurent des fonctions anaboliques à l'instar des GAPDH isolées d'archae (Talfournier *et al.*, 1998). Les enzymes d'origine chloroplastique (E.C.1.2.1.13) (Cerff et Chambers, 1978 ; Ferri *et al.*, 1978 ; Levy et Betts, 1989) fournissent des équivalents réducteurs *via* la formation de NADPH par déphosphorylation réductrice du 1,3-dPG en D-G3P. Cette corrélation entre rôle physiologique et spécificité de cofacteur a été confortée récemment par la caractérisation d'un système enzymatique tout à fait original spécifique de *Bacillus subtilis*. En effet, deux GAPDH sont présentes ayant des spécificités de cofacteur définies, celle utilisant le NAD étant impliquée dans la glycolyse alors que celle plus spécifique du NADP est impliquée dans la néoglucogenèse (Fillinger *et al.*, 2000).

3.1.2. Les ALDH non phosphorylantes

3.1.2.1. Nomenclature

Avant de montrer l'importance des ALDH non phosphorylantes au niveau physiologique, il est nécessaire de détailler les nomenclatures, ancienne et nouvelle, selon lesquelles cette famille est classée. Le nombre sans cesse croissant de séquences d'ALDH non phosphorylantes a nécessité la mise en place d'une nomenclature standard pour ces enzymes. Elle remplace une ancienne nomenclature, établie par Hempel et Lindahl, 1989, qui classait les ALDH d'eucaryotes supérieurs en quatre classes principales réparties de la manière suivante : la classe 1 correspondait aux ALDH d'origine cytosolique (Eckfeldt et Yonetani, 1976), la classe 2 aux ALDH d'origine mitochondriale (Farres *et al.*, 1989), la classe 3 aux ALDH inductibles par des agents cytotoxiques et enfin la classe 4 aux ALDH d'origine microsomale (Miyachi *et al.*, 1991). Bien que cette nomenclature soit encore utilisée (par exemple l'enzyme sur laquelle travaillent T.D. Hurley et H. Weiner est couramment appelée ALDH 2 mitochondriale), elle a été remplacée par une nouvelle classification proposée par Vasiliou et son équipe. Les ALDH sont désignées en fonction de leur taux d'identité de séquence. Si deux ALDH ont plus de 40% d'identité, elles seront regroupées dans la même famille. Avec un taux d'identité de séquence au moins égal à 60%, elles appartiendront à une même sous-famille (voir site internet <http://www.aldh.org>). Cette nomenclature, qui avait été initialement mise en place pour les ALDH d'origine eucaryote, a été depuis étendue aux enzymes bactériennes et d'archae. Dans cette classification, chaque enzyme est désignée par le

préfixe ALDH suivi d'un chiffre arabe pour la famille, une lettre pour la sous-famille et un chiffre arabe pour le gène (Schéma 7).

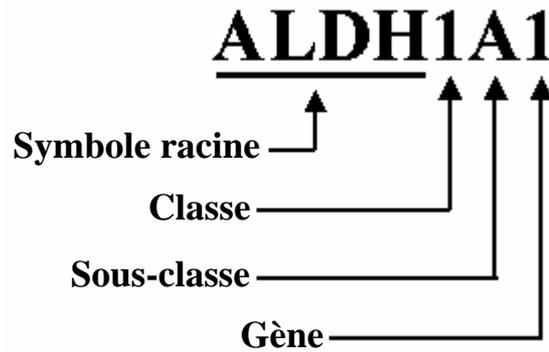


Schéma 7 : Représentation schématique du symbole utilisé pour la dénomination des ALDH eucaryotes.

Il existe une variante dans le cas de certaines ALDH humaines. En effet, pour une ALDH donnée, il peut exister plusieurs variants qui diffèrent entre eux par un ou deux résidus. Ceux-ci sont alors différenciés avec un astérisque et un chiffre arabe après le chiffre indiquant le gène. Par exemple, un variant de l'ALDH2 sera noté ALDH2*2.

3.1.2.2. Implication dans le métabolisme cellulaire

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la synthèse de β -alanine, qui est un intermédiaire de la biosynthèse de la vitamine B₅ (ou acide pantothénique) et du coenzyme A, est assurée par des ALDH cytosoliques codées par les gènes *ald2* et *ald3*. Ces enzymes catalysent la conversion du 3-aminopropanal en β -alanine lors de la croissance des cellules sur éthanol (White *et al.*, 2003).

La fonction principale de l'ALDH mitochondriale de classe 2 (désignée ainsi d'après l'ancienne nomenclature) est de transformer l'acétaldéhyde, produit d'oxydation de l'éthanol, en acétate qui est ensuite éliminé (Kraemer et Deitrich, 1968). Une perte totale ou partielle de l'activité de cette enzyme ou une consommation excessive d'alcool entraîne une saturation des systèmes de détoxification de l'éthanol. Ceci peut avoir des conséquences graves sur la cellule puisque l'acétaldéhyde présente des effets aussi bien cytotoxiques que génotoxiques ou encore tératogènes. Par exemple, une femme consommant de l'alcool régulièrement pendant sa grossesse présente de forts risques d'avoir un enfant atteint du syndrome d'alcoolisme fœtal (FAS). Ce syndrome est dû à une compétition entre les différents substrats d'ALDH, notamment l'acétaldéhyde et le rétinol, avec pour conséquence une baisse de production d'acide rétinoïque nécessaire à la bonne coordination spatio-temporelle du développement

embryonnaire (Yelin *et al.*, 2005). Ceci se traduit par des malformations craniofaciales, du cœur, des organes génitaux externes et des articulations, mais aussi par un retard global de la croissance et des anomalies du système nerveux couplées à un retard mental causé par une atrophie du cerveau (Warren et Li, 2005).

La γ -triméthylaminobutyraldéhyde déshydrogénase intervient au niveau de l'antépénultième étape de la voie de biosynthèse de la carnitine, qui est un transporteur des acides gras activés à travers la membrane interne de la mitochondrie pour la β -oxydation (Vaz *et al.*, 1999). Ce composé intervient également lors du transfert des produits de la β -oxydation péroxysomale (sous forme d'acétyl-CoA) vers la mitochondrie en vue de leur oxydation en CO₂ et H₂O au cours du cycle de Krebs (Vaz *et al.*, 1999). La γ -triméthylaminobutyraldéhyde déshydrogénase catalyse la conversion de γ -triméthylaminobutyraldéhyde en γ -butyrobétaine. Chez l'Homme, cette enzyme est également appelée ALDH9 cytosolique NAD-dépendante. Elle est présente dans le cytosol des cellules hépatiques, rénales, du cerveau, du cœur et des muscles (Lin *et al.*, 1996). Cette enzyme est également impliquée dans la production de bétaine, qui joue le rôle d'osmoprotectant cellulaire et de donneur de méthyle dans la biosynthèse de méthionine, en catalysant la conversion de bétaine-aldéhyde en bétaine (Vaz *et al.*, 1999).

3.1.2.3. Implication dans la communication synaptique

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur majoritaire dans le cerveau des mammifères. Sa libération dans la fente synaptique suivie de sa fixation sur des récepteurs synaptiques inhibe la transmission de l'influx nerveux entre deux neurones (Figure 4) (Gibson, 2005).

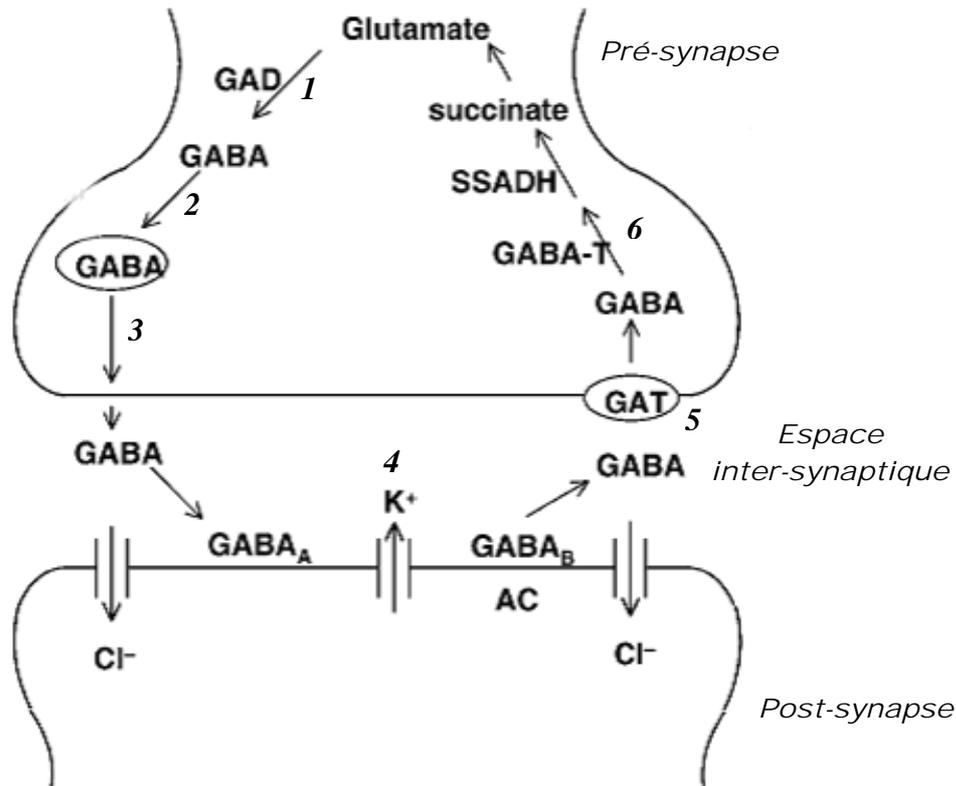


Figure 4 : Mécanisme de synthèse/dégradation de l'acide γ -aminobutyrique lors de la transmission de l'influx à travers une synapse GABAergique (d'après Gibson, 2005).

1 : synthèse de GABA catalysée par l'acide glutamique décarboxylase (GAD) ; *2* : incorporation du GABA dans une vésicule (processus ATP-dépendant) ; relargage du GABA dans l'espace inter-synaptique par fusion de la vésicule avec la membrane pré-synaptique ; *4* : fixation du GABA à la membrane post-synaptique *via* les récepteurs GABA_A et GABA_B ; *5* : incorporation du GABA dans une vésicule par un GABA transporteur (GAT) sur la membrane pré-synaptique ; *6* : dégradation du GABA en succinate avec, éventuellement, resynthèse de glutamate. GABA-T : GABA transaminase, SSADH : succinate semialdéhyde déshydrogénase, AC : adénylate cyclase.

Plusieurs ALDH sont impliquées dans le métabolisme du GABA, ce dernier intervenant dans la communication inter synaptique. L'ALDH9 impliquée dans la dernière étape de la voie de biosynthèse du GABA à partir de la putrescine catalyse la conversion de γ -aminobutyraldéhyde en GABA (Vaz *et al.*, 1999). Quant à la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH ou ALDH5A1), elle catalyse l'oxydation du succinate semialdéhyde en succinate qui sera ensuite transformé en glutamate. Ce glutamate sera éventuellement réutilisé pour une nouvelle synthèse de GABA (Testore *et al.*, 1999).

3.1.2.4. Rôles des ALDH dans l'appareil visuel

Le phénomène de vision est rendu possible par les propriétés d'absorption de la lumière que présente l'isomère *11-cis* du rétinaldéhyde (Duester, 2000). Or, les ALDH sont largement impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes au niveau des tissus oculaires. Ces

enzymes jouent donc un rôle important dans le processus de vision. Tout d'abord, les ALDH sont les seules cristallines connues retrouvées à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Piatigorsky *et al.*, 2000). L'ALDH1 de la cornée et du cristallin transforme le rétinol en acide rétinoïque (Graham *et al.*, 1996). De plus, plusieurs cristallines sont décrites intervenir dans la protection contre le stress oxydant au niveau de l'œil, notamment chez les céphalopodes où l'organe de vision est en contact direct avec l'eau de mer où les concentrations en formes radicalaires de l'oxygène générées photochimiquement et en métaux de transition sont élevées (Zinovieva *et al.*, 1993). Au niveau des organes impliqués dans la vision, la concentration des différentes ALDH est très importante. Ceci suggère qu'elles jouent un rôle supplémentaire dans ces tissus, en plus du rôle métabolique habituel. Ce rôle pourrait être d'absorber les rayonnements UV. Chez les mammifères, l'ALDH3A1, qui est l'ALDH majoritaire dans les cellules épithéliales de la cornée, joue plusieurs rôles dont un rôle de conversion du 4-HNE produit par peroxydation lipidique induite par les rayonnements ultraviolets. Cette enzyme est également impliquée dans la production de NAD(P)H nécessaire au recyclage du glutathion réduit (GS-SG) en glutathion oxydé (GSH), qui est nécessaire dans la lutte contre le stress oxydant. Ce NAD(P)H intervient également dans l'absorption directe de rayonnements UV, contribuant ainsi à la protection des tissus oculaires (Pappa *et al.*, 2003a ; Pappa *et al.*, 2003b). L'ALDH1A1 agirait de manière préférentielle sur un autre aldéhyde issu de cette peroxydation des lipides, le malondialdéhyde (MDA), qui peut lui aussi perturber le bon fonctionnement cellulaire en se conjuguant à de nombreuses biomolécules (Pappa *et al.*, 2003b).

3.1.2.5. Implication dans le développement embryonnaire

Comme nous l'avons vu brièvement dans les parties précédentes, les ALDH sont largement impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes. Cette particularité leur confère donc un rôle important dans les processus associés au développement embryonnaire. En effet, l'acide rétinoïque est défini comme un modulateur potentiel de l'expression des gènes et de la différenciation tissulaire (Maly *et al.*, 2003). Ce rôle est rendu possible *via* sa fixation à des récepteurs spécifiques, les récepteurs à acide rétinoïque (RAR) et récepteurs aux rétinoïdes (RXR) (Duester, 2000). Les complexes formés sont impliqués dans la signalisation du développement embryonnaire puisqu'ils se fixent sur des régions régulatrices (RARE) de gènes cibles afin d'initier leur transcription (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004). Par exemple, l'ALDH1 humaine, encore appelée Alhd2 chez la souris ou RALDH1 chez le rat, convertit les

isomères *tout-trans* ou *9-cis* du rétinol en acide rétinoïque correspondant (Lin *et al.*, 2003). Parfois, des récepteurs ne pouvant plus jouer leur rôle empêchent l'activation de cette enzyme et entraînent le phénomène de féminisation testiculaire, qui correspond à une modification de sexe au moment de la différenciation sexuelle, qui est due à une diminution de la quantité d'acide rétinoïque dans les tissus concernés (Napoli, 1999). L'ALDH6, encore appelée RALDH2, oxyde le *tout-trans* rétinol en acide *tout-trans* rétinoïque avec une efficacité supérieure à l'ALDH1 (Duester, 2000). Chez la souris, l'absence de RALDH2 entraîne des dysfonctionnements du système nerveux central, du système circulatoire, du système hématopoïétique et des malformations au niveau du tronc et des membres avec une mort de l'embryon à mi-gestation. Le fœtus avorté révèle un corps rétréci, une absence de bourgeonnement des membres, un cœur dilaté, une perte de l'arche branchiale postérieure (le même phénomène a été observé chez le poisson zèbre) et des dysfonctionnements sévères du cœur et du cerveau postérieur. Dans un embryon sain, la RALDH2 et le CYP26A1, qui appartient à la famille des cytochromes P450, ont un effet opposé de manière à maintenir une quantité optimale d'acide rétinoïque tout au long du développement. En effet, le CYP26A1 métabolise l'acide rétinoïque et l'empêche donc de jouer son rôle physiologique (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004).

3.1.2.6. Implication des ALDH dans certaines pathologies

Les différents troubles présentés dans ce qui suit concernent l'Homme. D'abord, une déficience en ALDH4 entraîne une hyperprolinémie de type II caractérisée par une accumulation de proline de 10 à 15 fois supérieure à la normale et une augmentation de P5C de 10 à 40 fois dans le plasma. Ce phénomène est dû à une erreur congénitale autosomale récessive dans le gène codant la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase du métabolisme. Cette déficience se traduit par des troubles neurologiques comme des attaques cérébrales ou des retards mentaux plus ou moins sévères (Hu *et al.*, 1996). Il arrive parfois chez certains adultes qu'aucun symptôme n'apparaisse. Ensuite, une déficience en SSADH, enzyme impliquée dans la synthèse du GABA, provoque une augmentation du taux de GABA et d'acide γ -hydroxybutyrique (GHB) dans le cerveau, le sang et les urines. Ceci se traduit par des troubles du comportement et des perturbations psychiatriques telles qu'un retard de développement intellectuel, moteur et d'élocution. Ces problèmes sont accompagnés d'hypotonie, d'hyporéflexie, d'attaques convulsives et myocloniques et d'ataxie. Il est à noter que les symptômes comme le retard mental et les troubles obsessionnels compulsifs sont la

base de l'autisme (Gibson, 2005 ; Wu *et al.*, 2006). L'ALDH3A1 peut également être la source de pathologies au niveau de l'œil. En effet, une diminution de l'expression ou certaines mutations du gène codant cette enzyme dans les tissus oculaires, notamment au niveau de la rétine et de la cornée, entraîne une augmentation de la quantité d'aldéhydes issus de la peroxydation des lipides induite par les rayonnements UV tels que le 4-HNE ou le MDA. Cette accumulation d'aldéhydes peut entraîner divers dysfonctionnements comme la cataracte, un décollement rétinien ou des rétinopathies. Des études ont montré que des cellules transfectées par ce gène étaient moins sensibles aux dommages générés par les rayonnements UV (Pappa *et al.*, 2003a). Enfin, un dernier exemple concerne la fatty aldéhyde déshydrogénase (ALDH3A2). Une dérégulation de cette enzyme est rencontrée dans certaines pathologies telles que les états hyper insulinémiques ou les diabètes de type I. Cette dérégulation cause une augmentation du stress oxydant lié au métabolisme des lipides. Une déficience en ALDH3A2 peut également être responsable du syndrome de Sjögren-Larson, qui est caractérisé par des symptômes neuro-cutanés comme un retard mental, une déficience respiratoire et des ichthyoses. Ce syndrome est dû à la formation d'adduits entre des aldéhydes et des biomolécules (Demozay *et al.*, 2004), notamment sur la myéline ou dans les tissus du cerveau et du cœur. Cependant, les mécanismes pathogènes ne sont pas clairement identifiés (Lin *et al.*, 2000).

3.1.2.7. ALDH et cancers

Les ALDH sont impliquées à différents niveaux dans le développement du cancer chez l'Homme. En premier lieu, les ALDH jouent un rôle dans l'élimination des médicaments anticancéreux tels que le cyclophosphamide. Cette propriété confère aux cellules cancéreuses une résistance aux substances utilisées lors de traitements. Par exemple, la forme active du cyclophosphamide, le 4-hydroperoxycyclophosphamide, est métabolisée par l'ALDH1 en carboxyphosphamide qui est inactif. Ce carboxyphosphamide sera ensuite excrété puis éliminé de l'organisme. Des études ont montré que l'activité ALDH1 est très élevée dans les cellules murines leucémiques résistantes aux traitements anti-cancéreux (Tsukamoto *et al.*, 1998 ; Lahouel *et al.*, 2004). Par contre, dans les cellules mammaires humaines cancéreuses, cette activité est faible alors que l'activité ALDH3 est très élevée. En effet, l'expression de l'ALDH3 est induite par les drogues anti-cancéreuses utilisées (Park *et al.*, 2002). Les ALDH peuvent être utilisées comme marqueurs moléculaires pour dépister les cellules cancéreuses. Par exemple, l'expression de l'ALDH3 est augmentée dans les cellules malades au niveau du

foie. Cette expression est montrée être tissus et médicaments spécifiques. En fait, le rôle de cette enzyme est de protéger les cellules contre les xénobiotiques, tels que les médicaments, mais également contre les produits issus de la peroxydation des lipides (Canuto *et al.*, 2003). Le taux d'expression de cette enzyme est donc utilisé pour évaluer le stade de différenciation des cellules tumorales du foie. Les ALDH peuvent également être impliquées de manière plus directe dans le développement de cancers. En effet, des études menées sur différents échantillons de la population asiatique ont montré qu'une déficience en ALDH2 mitochondriale augmente le risque de développer un cancer au niveau des organes impliqués dans la détoxification de l'éthanol tels que le foie, le colon, l'œsophage, l'estomac, les poumons ou l'appareil colorectal et oropharyngolaryngé. Ceci est dû à une accumulation d'acétaldéhyde dans les cellules puisque l'ALDH2 est le principal système d'élimination de cet aldéhyde issu de l'oxydation de l'éthanol. Chez la souris, il a été également montré qu'un carcinome hépatocellulaire est accompagné par une chute du taux d'expression de cette ALDH2 (Park *et al.*, 2002). Enfin, les ALDH sont impliquées dans la régulation de l'apoptose. Par exemple, l'ALDH4, ou P5C déshydrogénase, porte une séquence de fixation de la protéine p53. De plus, des études ont montré que l'inhibition de l'expression du gène de l'ALDH4 par un oligonucléotide anti-sens dans des cellules cancéreuses déficientes en protéine p53 stimulait la mort cellulaire de ces cellules lorsqu'elles sont transfectées avec un adénovirus codant cette protéine p53. Il est également connu que cette ALDH joue un rôle dans le métabolisme de la proline en catalysant la conversion irréversible du P5C en γ -glutamate semialdéhyde. Or, la proline est transformée en P5C par la proline oxydase (POX) en générant des formes activées de l'oxygène (FAO). Ces espèces vont créer un stress oxydant dans la cellule qui va entrer dans un processus d'apoptose *via* la protéine p53 (Figure 5). Dans ce contexte, l'action de l'ALDH4 permet d'épuiser la quantité de proline et donc de limiter le nombre de FAO produits et ainsi de réguler négativement l'action de p53 sur le cycle cellulaire (Yoon *et al.*, 2004).

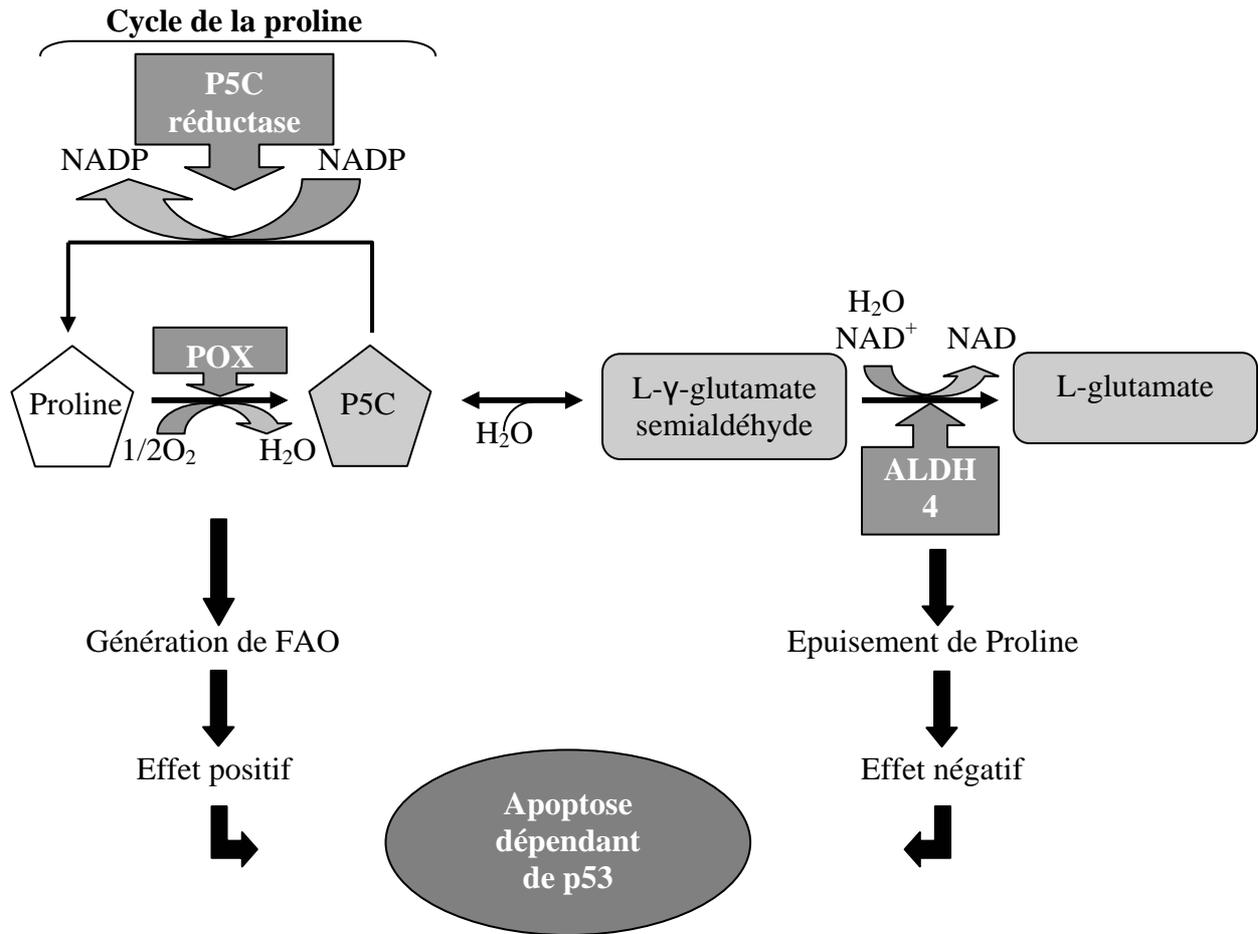


Figure 5 : Mécanisme d'action supposé de l'ALDH4 dans l'apoptose dépendante de la protéine p53 (d'après Yoon *et al.*, 2004).

La transcription des gènes codant la proline oxydase (POX) et l'ALDH4 sont régulés par la protéine p53. POX catalyse la conversion de la proline en P5C avec génération de formes activées de l'oxygène. P5C est converti en proline par la P5C réductase. De plus, P5C est irréversiblement converti en acide L-glutamique *via* le γ -semialdéhyde-L-glutamique par l'ALDH4 entraînant une diminution de la quantité de proline atténuant ainsi la génération de formes activées de l'oxygène due à l'oxydation de la proline.

3.1.2.8. Les ALDH en tant que protéines de structure

Au niveau des organes visuels, plusieurs protéines sont classées comme ALDH car elles présentent une identité de séquences supérieure à 50% lorsqu'elles sont comparées aux ALDH1 et 2. Bien souvent pourtant, ces protéines ne présentent pas d'activité. Par exemple, chez les céphalopodes, l' Ω -cristalline, parfois appelée L-cristalline, présente dans la cornée et le cristallin (Piatigorsky *et al.*, 2000), n'est pas active, l'analyse de la structure primaire montrant que la Cys catalytique est remplacée par une Arg (Zinovieva *et al.*, 1993). Par contre, chez la coquille Saint-Jacques, l'enzyme, dont la séquence est proche de l'ALDH2 humaine, a conservé les résidus catalytiques essentiels. Cette fois, l'absence d'activité est due à l'impossibilité pour l'enzyme de fixer le cofacteur. Cette enzyme présente également une

autre particularité par rapport aux autres protéines par son caractère dimérique (Piatigorsky *et al.*, 2000). Certaines cristallines présentent une activité ALDH. C'est le cas pour l'ALDH1, qui est appelée η -cristalline dans le cristallin. En effet, cette enzyme porte une activité rétinol déshydrogénase. Toutefois, la quantité importante retrouvée dans le cristallin des vertébrés (25% des protéines solubles) suggère plutôt un rôle structural de cette protéine dans ce tissu (Graham *et al.*, 1996).

3.1.2.9. Quelques exemples de rôles physiologiques des ALDH CoA dépendantes

La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH) catalyse la décarboxylation oxydative du malonate et du méthylmalonate en acétyl-CoA et propionyl-CoA. Au niveau physiologique, cette enzyme est impliquée dans le catabolisme de la valine chez les bactéries et les mammifères, où l'enzyme est très abondante dans le foie. Chez les mammifères, l'enzyme interviendrait également dans le catabolisme des pyrimidines. Chez la bactérie *B. subtilis*, la MSDH interviendrait dans le catabolisme du myo-inositol en catalysant la conversion du malonate semialdéhyde en acétyl-CoA. Chez l'Homme, une déficience en MSDH se traduit par un retard de développement. Mais ces cas restent toutefois rares (Pollitt *et al.*, 1985 ; Gray *et al.*, 1987 ; Gibson *et al.*, 1993).

Chez la bactérie *Salmonella enterica*, la protéine PdUP porte une activité propanaldéhyde déshydrogénase impliquée dans la voie de dégradation du 1,2-propanediol dépendante de la vitamine B12. Dans cette voie, PdUP catalyse la conversion du propionaldéhyde en propionyl-CoA.

Les ALDH non phosphorylantes peuvent également avoir un intérêt au niveau d'applications industrielles. En effet, les bactéries sont utilisées pour la production de solvants organiques tels que l'acétone, le butanol ou le propan-2-ol. Parmi les souches utilisées pour ces productions, il en existe certaines qui utilisent des ALDH CoA dépendantes dans les voies de biosynthèse de ces solvants. Par exemple, *Clostridium beijerinckii* utilise une ALDH acylante CoA dépendante codée par le gène *ald* dans la voie de production du butanol. Cette enzyme catalyse la transformation du butyryl-CoA en butyraldéhyde.

3.1.2.10. Rôles physiologiques de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (GAPN)

GAPN (EC 1.2.1.9) est une enzyme appartenant à la classe des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes. Elle présente 20 à 30% d'identité de séquence avec les autres ALDH. C'est une protéine homotétramérique organisée en dimère de dimères. GAPN catalyse l'oxydation irréversible du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en 3-phosphoglycérate (3PG) (Schéma 8). Dans la plupart des cas, c'est une enzyme strictement NADP dépendante.

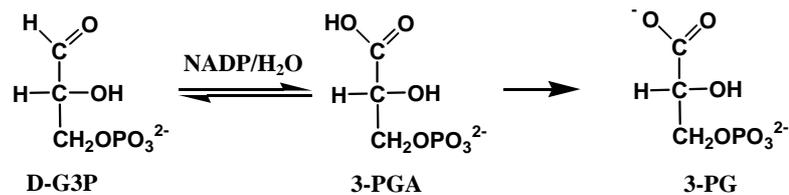


Schéma 8 : Réaction catalysée par GAPN.

De nombreuses études montrent que le rôle de GAPN dépend du type de tissu ou du type d'organisme dont elle est issue.

3.1.2.10.1. Chez les organismes photosynthétiques

Chez ces organismes, GAPN intervient dans le transfert des équivalents réducteurs, sous forme NADPH, produits lors des réactions de la photosynthèse dans le chloroplaste, vers le cytosol des cellules (Schéma 9).

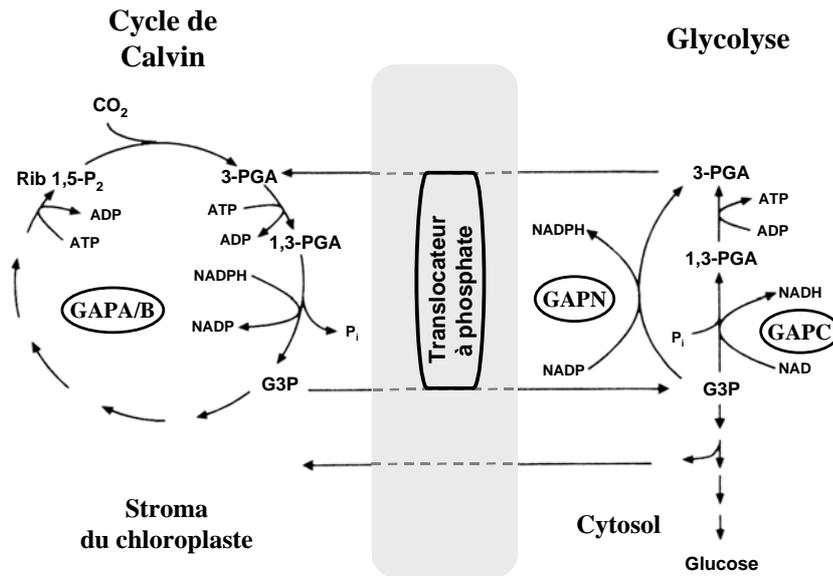


Schéma 9 : Rôle de GAPN dans le mécanisme de transfert d'équivalents réducteurs chez les plantes supérieures (d'après Habenicht et al., 1994).

3.1.2.10.2. Chez les organismes non photosynthétiques

La principale fonction de GAPN dans ces organismes est de produire les équivalents réducteurs nécessaires au métabolisme cellulaire. Valverde *et al.* (1999) ont aussi montré que GAPN pouvait permettre de contourner la voie phosphorylante du catabolisme du glucose où les GAPDH ont un rôle essentiel. En effet, la complémentation par GAPN d'une souche d'*E. coli* délétée du gène codant les GAPDH permet de restaurer une croissance aérobie sur un milieu contenant des oses. Par contre, la fermentation anaérobie en présence d'oses ou la croissance aérobie sur substrat gluconogénique reste impossible. Cette complémentation enzymatique permet donc un contournement de la voie phosphorylante impliquant une voie glycolytique sans rendement énergétique net (Schéma 10).

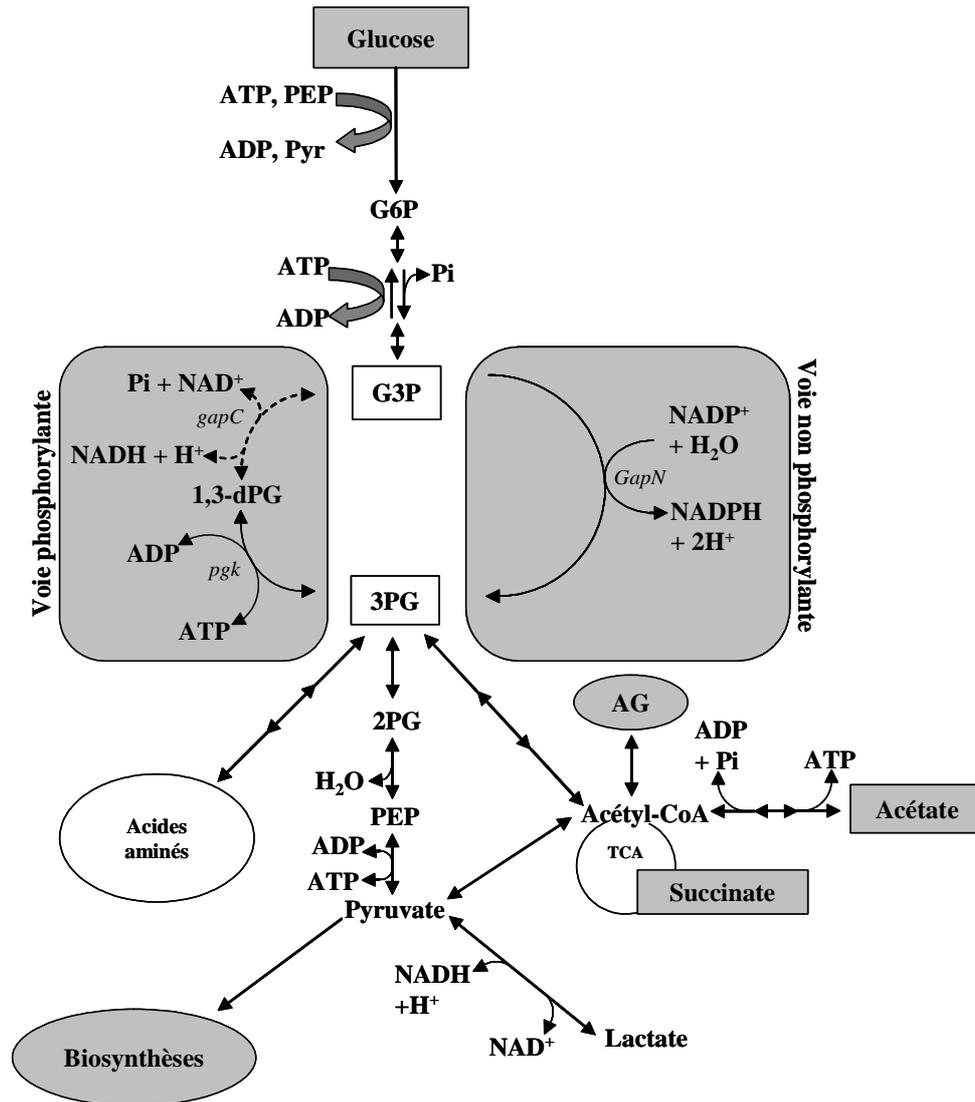


Schéma 10 : Voies phosphorylantes et non phosphorylantes de la glycolyse et connexion au métabolisme central et périphérique (d'après Valverde et al., 1999).
 Chaque voie est représentée dans un encadré gris. Les flèches en italique montrent les voies déficientes pour la souche d'*E. coli* modifiée. AG, pool d'acides gras ; TCA, cycle des acides tricarboxyliques.

3.1.2.10.3. Un cas particulier : la GAPN de *Thermoproteus tenax*

La GAPN de *T. tenax* est un cas particulier chez les GAPN. D'abord, cette enzyme est NAD dépendante. Ensuite, elle est soumise à une régulation allostérique de la part de différents métabolites qui modulent l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur oxydé. L'affinité de l'enzyme pour le cofacteur est augmentée par l'AMP, l'ADP, le glucose-1-phosphate et le fructose-6-phosphate, alors qu'elle est diminuée par le NADP(H), le NADH et l'ATP. Cette régulation peut s'expliquer par le rôle physiologique de l'enzyme chez cet archaé. En effet, sa fonction principale est d'augmenter la vitesse du catabolisme, notamment pour produire des

composés comme le 3-phosphoglycérate permettant ainsi d'obtenir plus rapidement de l'ATP ou des précurseurs de biosynthèses.

3.1.2.10.4. Régulation de l'activité de GAPN

Nous venons de voir que seule la GAPN de *T. tenax* est soumise à une régulation par des effecteurs. Cependant, d'autres travaux ont montré qu'il existait une autre forme de régulation de cette activité enzymatique dans les tissus non photosynthétiques. Cette régulation dépend de plusieurs facteurs. D'abord, GAPN peut être phosphorylée dans le cytosol des cellules. Les alignements de séquences mettent en évidence plusieurs sites potentiels avec une phosphorylation probable au niveau de la Ser404. Le degré de phosphorylation est le même pour chaque tétramère, bien que chaque monomère ne porte pas le même nombre de groupements phosphates (Bustos et Iglesias, 2002). Lorsque la protéine est phosphorylée, elle est reconnue par d'autres protéines. Ses partenaires appartiennent à la vaste famille des protéines 14-3-3, qui sont des protéines "scaffold". L'établissement d'interactions entre les partenaires nécessite que GAPN soit phosphorylée. La stoechiométrie de l'interaction est d'un tétramère GAPN pour deux protéines 14-3-3. La formation de ce complexe entraîne une diminution de la V_{max} de l'enzyme et un comportement différent vis-à-vis des nucléotides portant une adénine (Bustos et Iglesias, 2003). Toutefois, l'ajout de cations divalents tels que Mg^{2+} ou Ca^{2+} permet de restaurer l'activité initiale de l'enzyme. Ce phénomène d'"activation" est dû à la rupture de l'interaction entre GAPN et les protéines 14-3-3 par ces cations.

3.2. Structures tridimensionnelles des ALDH

3.2.1. Les ALDH phosphorylantes

Les ALDH phosphorylantes sont pour la plupart homotétramériques (Figure 6A), chaque monomère contenant une cystéine catalytique. Les GAPDH sont les mieux caractérisées. Chaque monomère est constitué d'environ 330 résidus constituant deux domaines distincts (Figure 6B). Le domaine catalytique, qui s'étend des résidus 149 à 310, est **constitué d'hélices α organisées en un feuillet β antiparallèle** et d'une boucle peu structurée (S-loop), qui assure l'oligomérisation *via* des interactions hydrophobes et participe également au maintien du cofacteur (Skarzynski *et al.*, 1987). Ce domaine possède deux sites de

reconnaissance anionique, appelés Ps et Pi, qui sont responsables de la fixation respective du phosphate en C₃ du substrat (D-G3P) et du phosphate inorganique (Skarzynski et Wonacott, 1988). Le domaine du cofacteur, qui englobe les 148 premiers acides aminés et les résidus C-terminaux (311 à 330), adopte un repliement de type "Rossmann fold" qui est un enchaînement de neuf brins β où s'intercalent quatre hélices α (Rossmann *et al.*, 1974). Ce motif est caractéristique des domaines de fixation du cofacteur dans de nombreuses déshydrogénases. Ce domaine de fixation du cofacteur peut être divisé en deux parties qui sont engagées dans des interactions avec les différentes parties de la molécule de NAD (Skarzynski *et al.*, 1987).

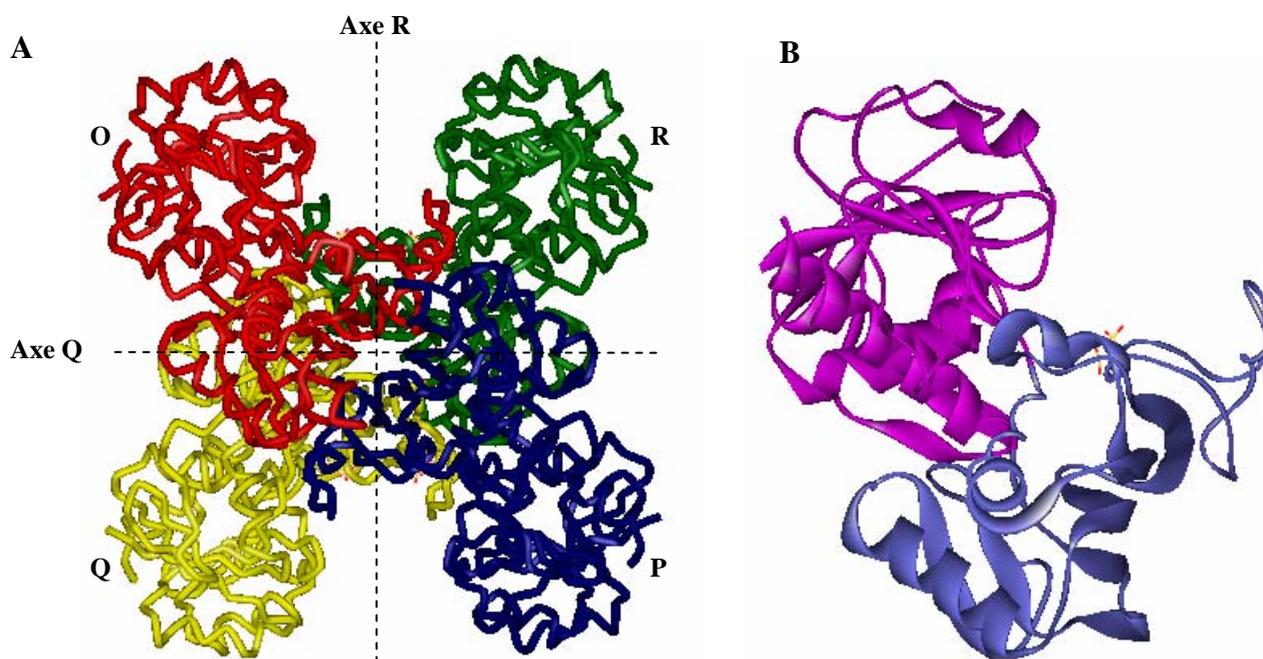


Figure 6 : Arrangement spatial des quatre sous-unités et structure tertiaire du monomère de la GAPDH phosphorylante de *Bacillus stearothermophilus* sous forme apoenzyme (Skarzynski et Wonacott, 1988).

A. Seules les chaînes principales sont représentées. Chaque sous-unité est colorée suivant la convention définie par Rossmann *et al.*, 1974. Les lettres O, P, Q et R indiquent chaque sous-unité et les axes P, Q et R sont indiqués en lignes discontinues. En B est représentée la structure en deux domaines du monomère avec deux atomes de sulfates fixés (en jaune) : domaine de fixation du cofacteur (en violet) et domaine catalytique (en bleu).

3.2.2. Les ALDH non phosphorylantes

A ce jour, les structures tridimensionnelles de onze ALDH non phosphorylantes et non CoA dépendantes sont disponibles dans la banque de données de structures cristallographiques "Protein Data Bank" (Liu *et al.*, 1997 ; Steinmetz *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1998 ; Moore *et al.*, 1998 ; Cobessi *et al.*, 1999 ; Lamb et Newcomer, 1999 ; Ni *et al.*,

1999 ; Ahvazi *et al.*, 2000 ; Pohl *et al.*, 2002 ; Bateman *et al.*, 2003 ; Gruez *et al.*, 2004). Trois d'entre elles sont organisées en homodimère et huit en homotétramère structuré en dimères de dimères. Le monomère est constitué de trois domaines : un domaine de liaison du cofacteur, un domaine catalytique et un domaine d'oligomérisation (Figure 7). La superposition des structures tridimensionnelles a révélé d'une part que les monomères adoptent un repliement similaire avec des chaînes principales quasiment superposables et d'autre part des différences significatives avec les ALDH phosphorylantes au niveau du mode de liaison du cofacteur NAD(P), de la topologie du domaine catalytique et de l'association des sous-unités.

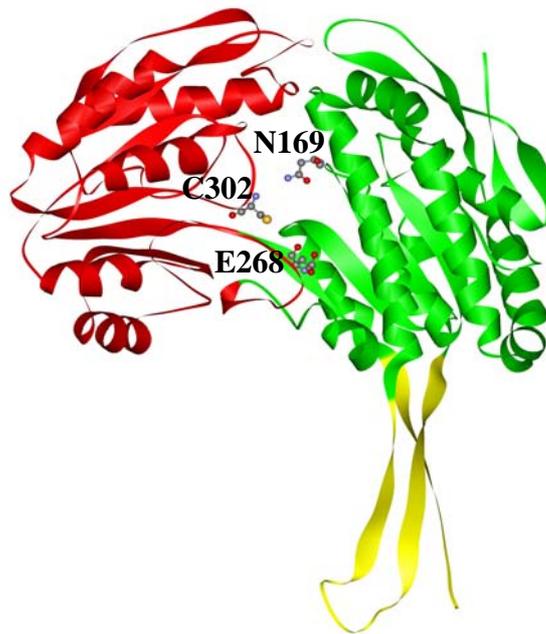


Figure 7 : Structure du monomère de la GAPN de *S. mutans* sous forme apoenzyme (*d'après Cobessi et al.*, 1999).

En vert est représenté le domaine de fixation du cofacteur, en rouge le domaine catalytique et en jaune le domaine d'oligomérisation. Les résidus C302, E268 et N169, essentiels à la catalyse, sont indiqués.

Par contre, aucune structure d'ALDH non phosphorylante CoenzymeA dépendante n'est disponible à ce jour. En effet, la structure tridimensionnelle de la 4-hydroxy-2-cétovalérate aldolase/acétaldéhyde déshydrogénase, enzyme bifonctionnelle de *Pseudomonas sp.* CF600, indique clairement que d'un point de vue structural le domaine portant l'activité acétaldéhyde déshydrogénase CoA dépendante n'appartient pas à la famille des ALDH non phosphorylantes mais présente une topologie de repliement semblable à celle des GAPDH phosphorylantes (Manjasetty *et al.*, 2003).

3.2.2.1. Structure du monomère

3.2.2.1.1. Le domaine de fixation du cofacteur

Ce domaine adopte une forme modifiée du repliement de Rossmann, motif caractéristique des déshydrogénases à cofacteur NAD(P). En effet, le repliement α/β est constitué de 5 brins β parallèles (βA à βE , nomenclature utilisée pour l'ALDH 2) connectés à 4 hélices α (αD à αG) au lieu de 6 brins β dans le repliement de Rossmann canonique (Rossmann *et al.*, 1974) et présente un feuillet β antiparallèle additionnel constitué de 2 brins β ($\beta 1$ et $\beta 2$). Le cofacteur NAD(P) est fixé de façon atypique à ce domaine (Liu *et al.*, 1997) (voir paragraphe 3.2.2.3).

3.2.2.1.2. Le domaine catalytique

Le domaine catalytique est également constitué d'un motif α/β composé de 6 brins β parallèles dont l'architecture globale est commune à l'ensemble des ALDH. Cependant, les ALDH présentent des spécificités structurales très variées et l'analyse des différentes structures cristallines disponibles a permis de corréler la spécificité de substrat à la forme et à la taille du site actif (Moore *et al.*, 1998) et à la présence ou non de résidus polaires ou hydrophobes (Cobessi *et al.*, 2000). La spécificité de GAPN pour le G3P implique l'existence d'un site de reconnaissance anionique pour le groupement phosphate en C3. La détermination de la structure tridimensionnelle de la forme appelée "Apo1" de la GAPN de *Streptococcus mutans* (Cobessi *et al.*, 1999) a permis de mettre en évidence 1) le caractère très hydrophile du site actif ; et 2) de caractériser des densités électroniques correspondant à deux molécules de sulfate. L'un des sulfates, appelé $SO_4^{2-}(a)$, mime le phosphate C₃ du G3P (voir paragraphe 3.3.2.2.1). Le second sulfate, situé dans le site de fixation du NADP, mime le phosphate 2' du ribose de l'adénosine. Les acides aminés catalytiques C302 et N169 sont localisés dans des boucles alors que le résidu E268 est localisé au niveau d'un brin β . Le rôle de ces résidus sera détaillé au paragraphe 3.3.2.2.

3.2.2.1.3. Le domaine d'oligomérisation

Le domaine d'oligomérisation est composé d'un feuillet β de trois brins antiparallèles et permet l'association des monomères en dimères puis en dimères de dimères pour les ALDH tétramériques.

3.2.2.2. Organisation quaternaire

L'organisation des monomères au sein des ALDH dimériques et tétramériques diffère très peu. La formation du dimère est assurée par des liaisons hydrogène établies entre les hélices α_G (résidus 247-259, numérotation standard définie par Wang et Weiner, 1995) de deux monomères et entre des résidus appartenant au dernier brin β du domaine d'oligomérisation (brin β_{18}) d'un monomère et au dernier brin β du domaine catalytique (brin β_{19}) du monomère adjacent pour former deux feuillet β composés de dix brins chacun. La cohésion du tétramère est assurée par des interactions dimère-dimère *via* l'établissement de liaisons hydrogène entre les domaines d'oligomérisation des quatre monomères (Figure 8).

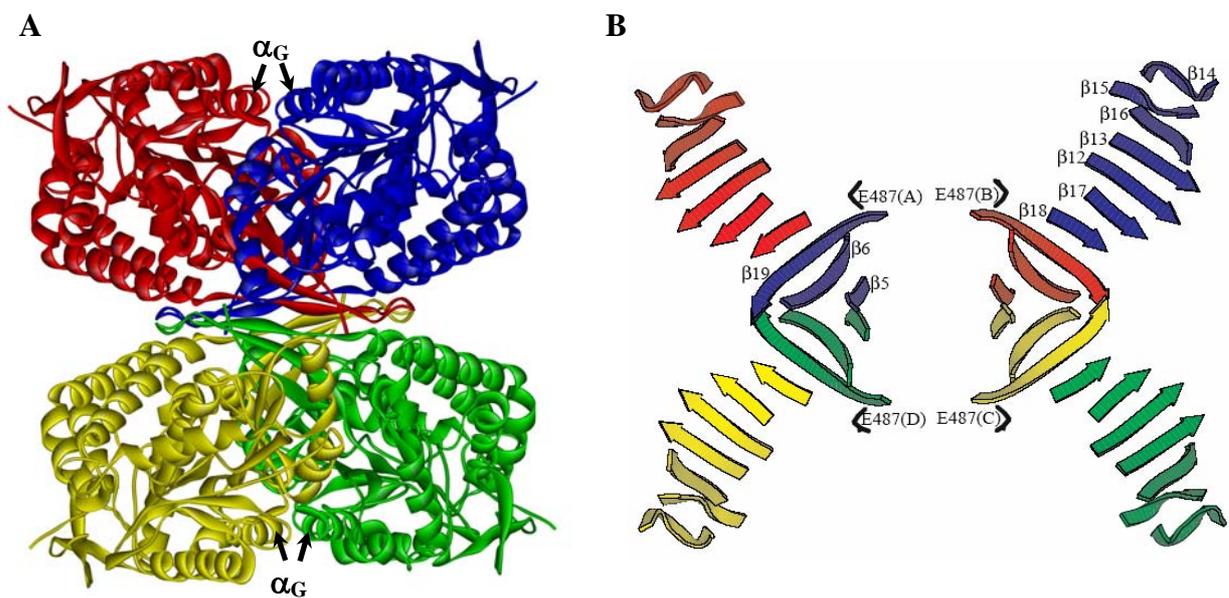


Figure 8 : Organisation quaternaire adoptée par les ALDH tétramériques.

A. Représentation schématique de la structure du tétramère de la GAPN de *S. mutans* sous forme apoenzyme. Seule la chaîne principale est représentée sur cette figure alors que la position de l'hélice α_G est indiquée par une flèche (*d'après* Cobessi *et al.*, 1999).

B. Représentation schématique des interfaces intra-dimères et inter-dimères du tétramère de l'ALDH 2 bovine. Seuls les brins β appartenant aux domaines catalytique et d'oligomérisation sont représentés. Il est à noter que le domaine d'oligomérisation de chaque monomère est impliqué dans des contacts intra et inter-dimères (*d'après* Steinmetz *et al.*, 1997).

Un certain nombre de facteurs structuraux semblent être responsables de l'existence de deux états oligomériques fonctionnels chez les ALDH. Pour l'ALDH dimérique de rat (ALDH3) (Liu *et al.*, 1997), l'absence d'état tétramérique serait la conséquence d'une rotation du domaine d'oligomérisation et de la présence d'une boucle supplémentaire du côté N-terminal, alors que pour l'ALDH de *Vibrio harveyi*, une boucle supplémentaire du côté C-terminal est décrite masquer le feuillet β du domaine d'oligomérisation (Ahvazi *et al.*, 2000). Une étude plus récente suggère plutôt que le caractère hydrophobe plus marqué des surfaces présentes au niveau de l'interface dimère dimère dans les ALDH tétramériques, par rapport aux régions équivalentes dans les ALDH dimériques, favoriserait l'oligomérisation en tétramère (Rodriguez-Zavala et Weiner, 2002).

3.2.2.3. Mode de liaison du cofacteur

La nomenclature utilisée par les différents auteurs pour nommer les différents éléments de structure secondaire régulière (ici uniquement les hélices α ou brins β) impliqués dans la liaison du cofacteur n'est pas homogène. La nomenclature employée dans la suite de ce paragraphe est celle définie par Liu *et al.* (1997) lors de la détermination de la première structure tridimensionnelle d'une ALDH.

L'inspection des premières structures cristallines de complexes binaires ALDH non phosphorylantes/NAD a permis de mettre en évidence un mode de liaison du cofacteur significativement différent de celui associé au repliement de Rossmann canonique des déshydrogénases NAD(P) dépendantes (Liu *et al.*, 1997 ; Steinmetz *et al.*, 1997). Certaines caractéristiques structurales de ce mode de liaison sont communes à l'ensemble des structures cristallines de complexes binaires actuellement disponibles, à savoir :

- l'absence de la signature GXGXXG caractéristique des déshydrogénases (Wierenga *et al.*, 1986), habituellement associée à la boucle connectant l'extrémité C-terminale du brin β A à l'extrémité N-terminale de l'hélice α A. La conformation de cette boucle permet l'établissement d'une interaction stabilisatrice charge-dipôle entre le pyrophosphate du cofacteur et l'hélice α A. Dans les ALDH non phosphorylantes, cette boucle est plus grande et contient le résidu conservé W168 (F168 dans les GAPN) ainsi que les résidus invariants N169 et P171. Ce dernier imposerait des contraintes géométriques ayant pour conséquences d'exposer davantage le cofacteur à la surface et d'entraîner un mouvement de la partie adénosine/pyrophosphate du NAD (Johansson *et al.*, 1998).

- l'existence d'un motif GstX₂G, proche du "motif glycine" canonique, au niveau de la boucle connectant le brin βD et l'hélice αD. Par contre, la stabilisation du pyrophosphate n'est plus assurée par interaction électrostatique avec la charge positive partielle générée par le macrodipôle d'une hélice α comme observé pour la plupart des déshydrogénases. Pour la GAPN de *S. mutans*, le pyrophosphate est stabilisé par l'établissement de liaisons hydrogène d'une part entre le phosphate adjacent à l'adénosine et la S246, qui est un des résidus hautement conservés de la signature GstX₂G, et d'autre part entre le phosphate adjacent à la partie nicotinamide mononucléotide (NMN) et la F168 (Figure 9).

- la stabilisation du noyau adénine par interactions hydrophobes avec des résidus présents dans une poche délimitée par les hélices αC et αD (résidus G210 et G214 pour la GAPN de *S. mutans*). Le ribose de la partie adénosine est stabilisé par liaisons hydrogène entre le résidu invariant K192 et les groupements hydroxyles 2' et 3' mais également dans les ALDH NAD dépendantes entre le résidu E195 et le groupement hydroxyle 2'. Par contre, dans les ALDH NADP dépendantes comme GAPN ou l'ALDH de *V. harveyi*, un résidu thréonine est retrouvé à cette position (Marchal et Branlant, 2001 ; Byers et Meighen, 1984). L'inspection de la structure tridimensionnelle de la GAPN de *S. mutans* révèle que cette thréonine, localisée dans une boucle, forme des interactions de type liaisons hydrogène, *via* le groupement NH peptidique et la fonction hydroxyle de sa chaîne latérale, avec un des oxygènes du groupement phosphate en position 2' du ribose de l'adénosine (Cobessi *et al.*, 1999). Au niveau des ALDH, la position 195 est donc discriminante pour la sélectivité de cofacteur puisque des études ont montré que l'introduction d'une charge négative à cette position conduit à une déstabilisation de l'interaction avec le NADP par répulsion électrostatique et perte d'interactions.

Dans la plupart des structures cristallines disponibles, la partie nicotinamide mononucléotide (NMN) apparaît beaucoup plus flexible, ce qui se caractérise par une densité électronique plus faible voire absente. L'existence de deux conformations distinctes a été proposée pour les ALDH de classe 1 (Moore *et al.*, 1998) et de classe 2 (Steinmetz *et al.*, 1997). Ces conformations diffèrent par le positionnement de la partie NMN par rapport à la partie adénosine monophosphate. Il a été proposé que la conformation étendue est compatible avec le transfert d'hydrure alors que la conformation contractée est compatible avec l'étape d'hydrolyse (l'importance fonctionnelle de ces conformations sera discutée plus en détail dans le chapitre 3.3.2.2.3). Les interactions potentielles pouvant s'établir pour ces deux conformations entre la portion NMN et les résidus du site actif ont été décrites en détail pour

l'ALDH 2 (Perez-Miller et Hurley, 2003). Dans la conformation dite "transfert d'hydrure" le ribose adjacent au nicotinamide est stabilisé par liaisons hydrogène entre ses groupements hydroxyles en position 2' et 3' et le groupement carboxylate de la chaîne latérale du résidu E399. Au niveau de chacune de ses faces, le cycle du ribose établit des contacts de Van der Waals soit avec la chaîne principale du résidu G245, soit avec le cycle aromatique de la F401 (distance $\sim 3,5$ Å). Enfin, le cycle nicotinamide est positionné entre les chaînes latérales des résidus C302 et T244, chacune à $\sim 3,5$ Å du cycle (Figure 9A). Dans la conformation dite "hydrolyse", le ribose est déplacé de $\sim 3,5$ Å vers la surface et subit une rotation d'environ 80° . La conséquence est que seul l'hydroxyle en 2' est susceptible d'établir une liaison hydrogène avec le résidu E399, alors que l'hydroxyle en 3' pourrait établir une liaison hydrogène avec le résidu Q349 et qu'aucune interaction ne semble s'établir avec les faces du cycle du ribose. De plus, le nicotinamide est déplacé de ~ 4 Å et subit une rotation d'environ 30° pour occuper la position du ribose dans la conformation précédente (Figure 9B).

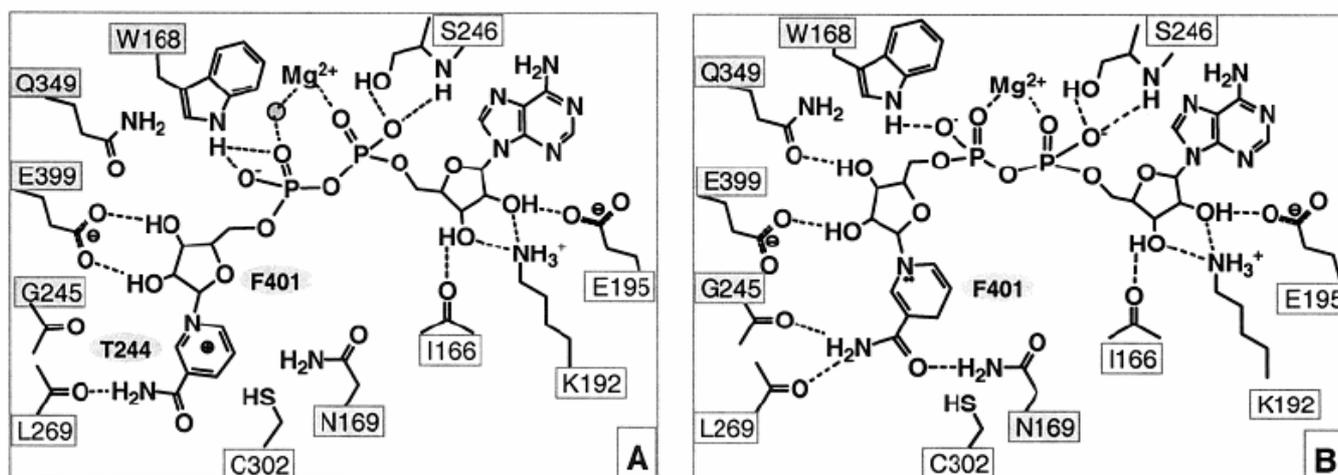


Figure 9 : Représentation schématique des interactions pouvant s'établir entre le NAD et les résidus de l'ALDH 2 humaine qui l'entourent (tirée de Perez-Miller et Hurley, 2003).

(A) Conformation dite "transfert d'hydrure" et (B) dite "hydrolyse". Les liaisons hydrogène potentielles sont représentées sous la forme de tirets pour des distances de 2,5 à 3,2 Å. Les deux conformations diffèrent à partir du phosphate adjacent au ribose de l'adénosine.

3.3. Mécanisme réactionnel des ALDH

3.3.1. Les ALDH phosphorylantes

3.3.1.1. Mécanisme cinétique

La GAPDH étant l'ALDH phosphorylante la mieux caractérisée tant au niveau de son mécanisme que de sa structure, ce paragraphe lui sera essentiellement consacré.

La caractérisation du mécanisme réactionnel de la GAPDH a été entreprise par de nombreux auteurs sur la base d'études cinétiques, qui ont cependant mené à des conclusions différentes et controversées. Orsi et Cleland (1972) ont proposé un mécanisme réactionnel Ter-Bi qui a été conforté par cette même équipe sur la base d'études d'effets isotopiques (Canellas et Cleland, 1991). Néanmoins, Liu et Huskey (1992) ont réfuté ce mécanisme et soutiennent le mécanisme ping-pong (double déplacement) initialement proposé par Segal et Boyer en 1953. Celui-ci avait été conforté et affiné par des études cinétiques (Trentham, 1971a ; Trentham, 1971b ; Harrigan et Trentham, 1974 ; Duggleby et Dennis, 1974a ; Duggleby et Dennis, 1974b ; Meunier et Dalziel, 1978). C'est ce mécanisme qui est le plus couramment accepté de nos jours bien que le mécanisme proposé par Orsi et Cleland n'ait pu être totalement réfuté.

De plus, les études cinétiques réalisées par différentes équipes dont la notre (Trentham, 1971a ; Orsi et Cleland, 1972 ; Corbier *et al.*, 1990 ; Corbier *et al.*, 1994) suggèrent que les étapes limitantes de la réaction seraient :

- pour le sens phosphorylation oxydative : la phosphorylation à pH acide, et une étape associée au relargage du NADH à pH basique
- pour le sens déphosphorylation réductrice : le relargage du D-G3P à pH acide et un changement conformationnel associé à la fixation du NADH à pH basique.

3.3.1.2. Mécanisme catalytique

Deux acides aminés sont directement impliqués dans la catalyse (Schéma 11) :

- le résidu invariant C149 joue le rôle de nucléophile essentiel en permettant la formation des intermédiaires hémithioacétal et thioacylenzyme ;
- le résidu invariant H176 joue trois rôles dans le mécanisme réactionnel à savoir 1) l'activation de la C149 *via* la formation d'une paire d'ions C149⁻/H176⁺ (Talfournier *et al.*,

1998), 2) le rôle de catalyseur acide-base lors du transfert d'hydrure et ; 3) la stabilisation des intermédiaires tétraédriques formés au cours du processus catalytique.

ACYLATION

PHOSPHOROLYSE

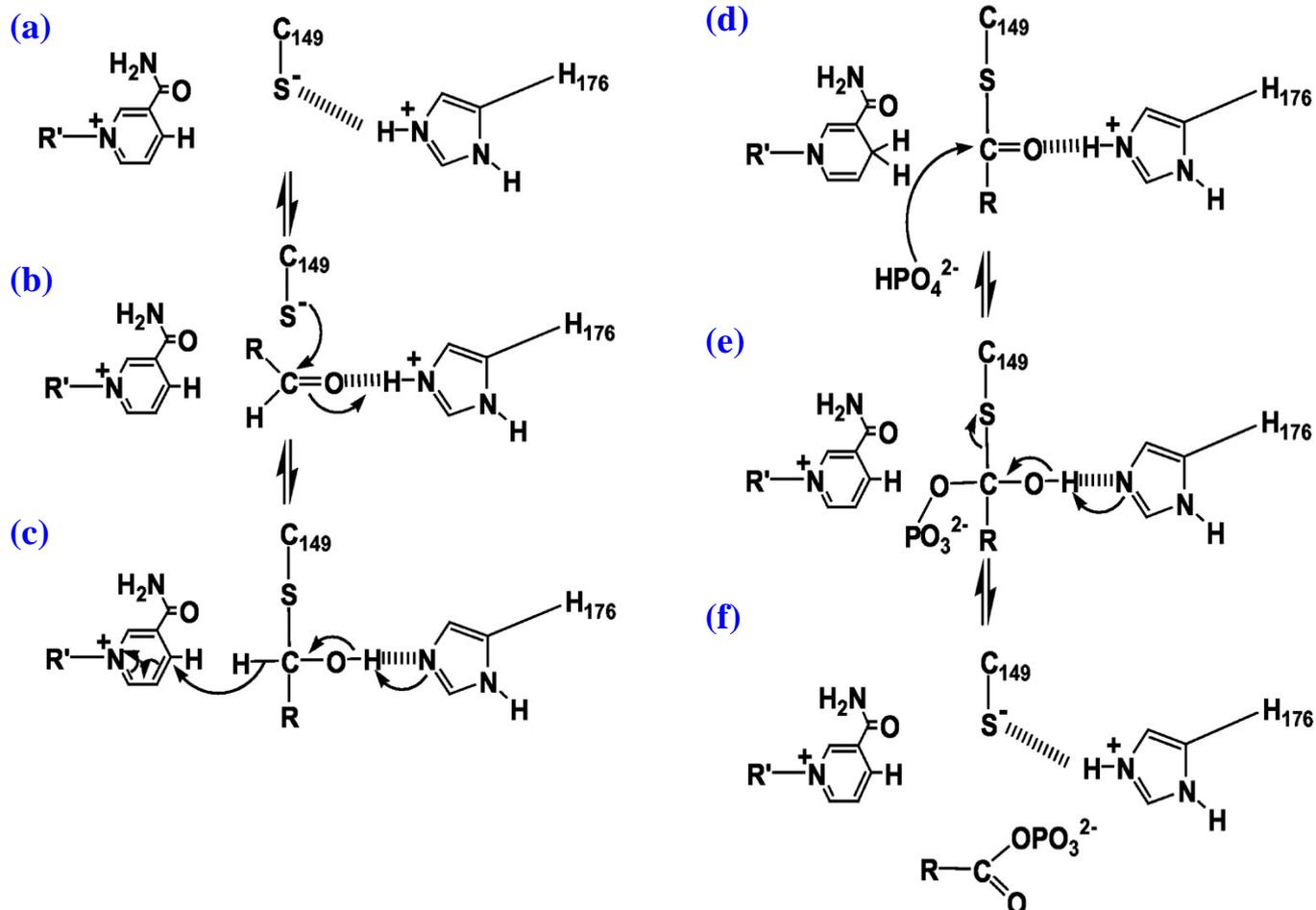


Schéma 11 : Représentation schématique du mécanisme réactionnel proposé pour les GAPDH phosphorylantes (figure adaptée de Talfournier *et al.*, 1998). Le mécanisme catalytique peut être divisé en deux étapes. Dans l'étape d'acylation, les résidus C149 et H176 forment une paire d'ions (a). Ceci conduit à une diminution du pK_{app} de la C149, facilitant ainsi l'attaque nucléophile du thiolate sur le C-1 du D-G3P. Le rôle de l'His176 est également de stabiliser la liaison du substrat dans le complexe Michaelien GAPDH/NAD/D-G3P (b), l'intermédiaire thiohémiacétal (c), et l'intermédiaire thioacylzyme (d). De plus, l'His176 joue le rôle de catalyseur basique facilitant le transfert d'hydrure du thiohémiacétal vers le noyau nicotinamidium du NAD (c).

Dans l'étape de phosphorolyse, la liaison du phosphate inorganique au thioacylzyme est suivie de son attaque nucléophile sur le C₁ de l'intermédiaire thioacylzyme (d), qui conduit *via* un intermédiaire sp^3 phosphorylé (e) à la formation et au relargage du produit 1,3-dPG (f). L'His176 est postulée stabiliser l'intermédiaire tétraédrique (e) et faciliter, comme catalyseur acide (d) et basique (e), la formation de l'1,3-dPG.

La vitesse du transfert d'acyl est fortement accélérée par la présence du NAD qui, par la présence de sa charge positive, favoriserait l'attaque nucléophile du phosphate dianionique facilitant ainsi la formation de l'ester phosphorique (Trentham, 1968 ; Biesecker *et al.*, 1977). Cependant, l'étape d'échange de cofacteur, qui consiste au relargage du NADH avant la liaison d'une nouvelle molécule de NAD et du phosphate inorganique, reste controversée. R représente la partie CH(OH)COPO₃ du substrat D-G3P. R' représente la portion adénine-ribose-phosphate-phosphate-ribose du cofacteur NAD.

L'implication de résidus cystéine et histidine dans la catalyse semble être une caractéristique commune à la famille des ALDH phosphorylante. En effet, l'ASADH mentionnée précédemment (paragraphe 3.1.1 page 18-19), assure une catalyse similaire à celle de la GAPDH. L'utilisation de sondes chimiques couplée à des expériences de protection avaient permis la mise en évidence du rôle essentiel d'un résidu cystéine dans la catalyse (Biellmann *et al.*, 1980 ; Karsten et Viola, 1992). Celui-ci a ensuite été identifié par mutagenèse dirigée (Karsten et Viola, 1992). De plus, l'inspection de la structure cristalline de l'ASADH isolée d'*E. coli* a conduit à l'identification d'un résidu histidine pouvant jouer un rôle de catalyseur acide-base à l'instar de l'H176 des GAPDH.

3.3.2. Les ALDH non phosphorylantes

3.3.2.1. Mécanisme cinétique

Un mécanisme cinétique de type séquentiel ordonné a été mis en évidence et semble être commun à l'ensemble des ALDH non phosphorylantes CoA indépendantes de mammifères ainsi qu'aux GAPN de plantes et de *S. mutans* (Bradbury et Jakoby, 1971 ; Eckfeldt et Yonetani, 1976 ; MacGibbon *et al.*, 1977 ; Bostian et Betts, 1978 ; Vallari et Pietruszko, 1981 ; Trost et Pupillo, 1993 ; Marchal *et al.*, 2000). Ce mécanisme implique la fixation du cofacteur oxydé suivie de celle du substrat aldéhyde. Après les différentes étapes de la catalyse chimique, le premier produit libéré est l'acide carboxylique, suivi du cofacteur réduit. L'acide formé se dissociant ensuite en solution sous forme carboxylate, la réaction peut être considérée comme irréversible.

L'étape limitante de la réaction apparaît être différente selon le type d'isoenzymes. Elle serait associée à la dissociation du coenzyme pour les enzymes de classe 1 (Blackwell *et al.*, 1987), à la désacylation pour les enzymes de classe 2 (Feldman et Weiner, 1972 ; Weiner *et al.*, 1976) et pour la GAPN de *S. mutans* (Marchal *et al.*, 2000) et enfin au transfert d'hydrure pour l'ALDH de classe 3 (Mann et Weiner, 1999).

En ce qui concerne les ALDH non phosphorylantes CoA dépendantes, un mécanisme cinétique de type bi uni uni ping pong a été décrit pour l'acétaldéhyde déshydrogénase (tétramérique) et la succinate semialdéhyde déshydrogénase (dimérique) (Shone et Fromm, 1981 ; Sohling et Gottschalk, 1993). Ce mécanisme implique tout d'abord la fixation du cofacteur oxydé suivie de la fixation du substrat aldéhyde, du relargage du cofacteur réduit puis de l'attaque du CoA et du relargage du thioester. Les résultats récemment obtenus par

notre équipe sur la MSDH de *B. subtilis* sont également compatibles avec un mécanisme de type ping pong (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Dans ce cas particulier, le mécanisme réactionnel présente une étape supplémentaire à savoir la décarboxylation du substrat qui se produit après le relargage du cofacteur réduit et avant l'étape de transtioestérification, l'étape limitante de la réaction étant associée au processus de décarboxylation.

3.3.2.2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des ALDH non phosphorylantes CoA indépendantes a fait l'objet de nombreuses études qui ont mis en évidence le rôle essentiel de plusieurs résidus invariants dans la catalyse, en particulier les résidus C302 et E268 (Farres *et al.*, 1995 ; Vedadi *et al.*, 1995; Wang et Weiner, 1995).

Plus récemment, la caractérisation de facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans le mécanisme catalytique de GAPN a été décrite par notre équipe (Marchal et Branlant, 1999 ; Marchal *et al.*, 2000 ; Cobessi *et al.*, 2000) et un scénario original pour le mécanisme réactionnel a été proposé. Ces résultats ont été confortés par la détermination des structures tridimensionnelles de GAPN en absence de cofacteur (forme "apo1" avec un sulfate SO_4^{2-} (a)), en présence de cofacteur (forme "apo-like"), sous la forme d'un complexe ternaire non covalent et sous une forme mimant vraisemblablement l'état de transition tétraédrique (forme "apo2" avec une seconde molécule de sulfate SO_4^{2-} (b)) (Cobessi *et al.*, 1999 ; Cobessi *et al.*, 2000) (Figure 10).

En terme d'évolution, l'ensemble des résultats mentionnés dans les paragraphes suivants s'avère intéressant car GAPN, bien que catalysant une réaction très similaire, se différencie des GAPDH phosphorylantes de par la structure tridimensionnelle mais également de par la nature des facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans 1) l'activation de la Cys catalytique, 2) le transfert d'hydrure et ; 3) la stabilisation des différents états de transition et intermédiaires formés.

3.3.2.2.1. Etape d'acylation

Dans un premier temps, l'efficacité de l'étape d'acylation dans GAPN est assurée par un mécanisme d'activation de la C302 associé à un changement conformationnel du site actif induit par la fixation du cofacteur, qui est un processus lent lorsque le substrat n'est pas présent. Ce processus conduit à une forme holoenzyme caractérisée par une augmentation de

l'accessibilité et une diminution du pK_{app} de la C302 de 8,5 à 6,2 ce qui assure une réactivité optimale à pH 7. Ces études ont également permis de révéler l'existence à proximité de la C302 d'un acide aminé de pK_{app} 7,6 dont la déprotonation conduit à l'augmentation de la vitesse associée à l'étape d'acylation d'un facteur 4. De plus, il a été montré que l'efficacité de cette réorganisation dépendait d'un certain nombre de facteurs comme la nature du cofacteur, la déprotonation d'un acide aminé de pK_{app} 5,7, la température et était fortement favorisée par la fixation du D-G3P (vitesse augmentée d'un facteur 10^6).

Les données structurales, déduites des structures des formes Apo1, Apo2 et du complexe ternaire non covalent C302SGAPN/NADP/G3P ont permis de proposer un scénario où la transition apo-holoenzyme, suite à la fixation du cofacteur, s'accompagne de la rupture du pont salin entre les résidus E268 et R459 et d'une réorientation des chaînes latérales des résidus E268, C302 et R459 (Figure 10).

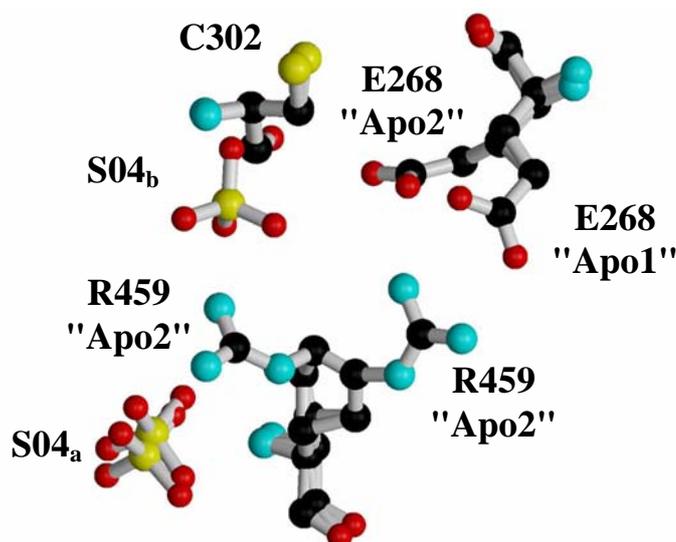


Figure 10 : Superposition des structures du site actif des formes appelées "Apo1" et "Apo2".

Figure réalisée à partir des coordonnées des structures tridimensionnelles de GAPN "Apo1" (Cobessi *et al.*, 1999) et "Apo2" (Cobessi *et al.*, 2000).

Ceci conduit à une modification de l'environnement de E268. Dans la forme "Apo1", cet environnement est composé du résidu R459 qui forme un pont salin avec E268 ainsi que des résidus N242, T244 et Q476, alors que dans la structure "Apo2" et dans le complexe ternaire non covalent C302SGAPN/NADP/G3P, E268 est entouré des résidus L174, T244, T303, L427 et F465 (Figure 11 A et B). Le caractère hydrophobe des résidus L174, L427 et F465 pourrait expliquer le pK_{app} élevé de E268 qui passerait de 5,7 dans la paire d'ions E268⁻/R459⁺ présente au niveau de l'apostructure à 7,6 dans l'holostructure.

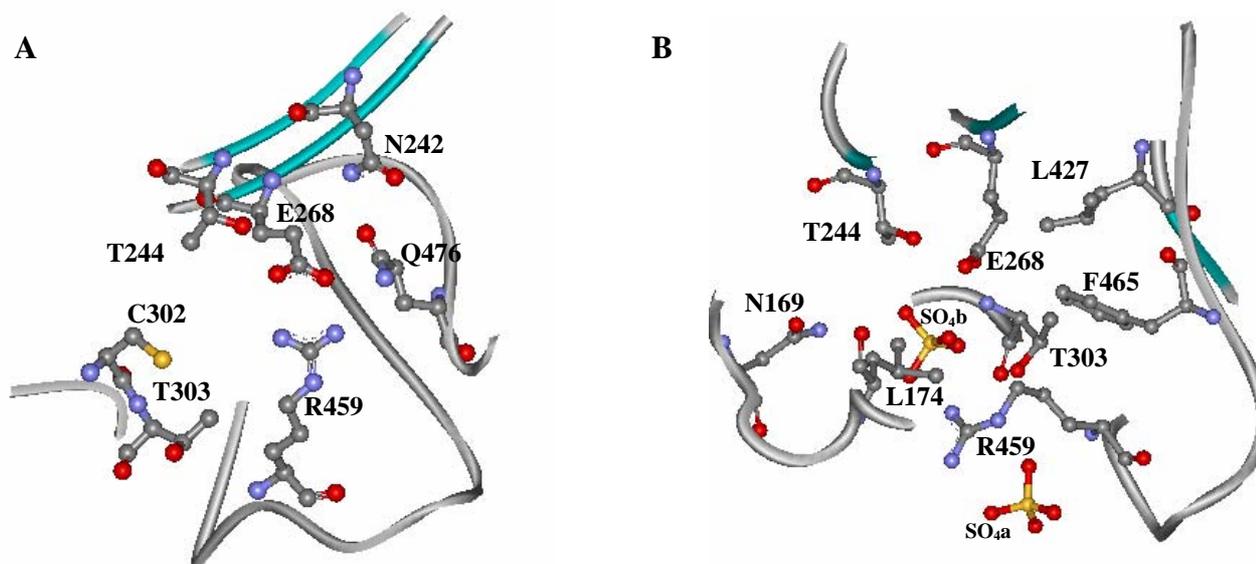


Figure 11 : Représentation schématique de l'environnement autour des résidus E268 et R459 dans les structures tridimensionnelles des formes appelées "Apo1" (A) et "Apo2" (B) de la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi *et al.*, 2000). Les résidus N242, T244 et E268 sont localisés dans des brins β . Par contre, les résidus L174, T303, L427, R459, F465 et Q476 sont tous localisés au niveau de boucles. Quant à la C302, elle est localisée dans un coude β .

La stabilisation de la forme thiolate de la C302 résulte de la combinaison de différents effets additifs locaux tels que la charge positive du cycle pyridinium du NADP, la chaîne latérale des résidus N169 et R459, ainsi que les groupements NH peptidiques des résidus C302 et T303. L'attaque nucléophile de la C302 sur la fonction aldéhyde du substrat conduit alors à la formation de l'intermédiaire tétraédrique hémithioacétal dont la charge négative portée par l'oxygène en C₁ est stabilisée par un site de reconnaissance oxyanion composé de la chaîne latérale de N169 et des groupements NH peptidiques des résidus 302 et 303 (Cobessi *et al.*, 2000). Ce site de reconnaissance anionique, associé à un positionnement adéquat de la partie nicotinamide du cofacteur par rapport à l'intermédiaire hémithioacétal, permet ainsi d'avoir un transfert d'hydrure efficace sans l'assistance d'une catalyse basique (Cobessi *et al.*, 2000) et stabilise vraisemblablement l'intermédiaire thioacylenzyme formé. Au niveau cinétique, des mesures d'effets isotopiques de substrat en présence de D-[1-²H]-G3P ont montré que le transfert d'hydrure était le processus limitant associé à l'étape d'acylation (Cobessi *et al.*, 2000).

Enfin, l'efficacité de cette étape d'acylation dépend de la reconnaissance et du positionnement du substrat dans le site actif. Les résidus R124, R301 et R459, invariants dans toutes les séquences de GAPN, interviennent dans la reconnaissance du substrat G3P. Le

résidu R124 est impliqué essentiellement dans la fixation du G3P par interaction avec le phosphate en C₃. Par contre, les résidus R301 et R459 stabilisent la fixation du G3P et favorisent son positionnement adéquat au sein du complexe ternaire pour permettre une attaque efficace du thiolate de la C302 sur la fonction aldéhyde en C₁ (Marchal et Branlant, 2002).

3.3.2.2.2. Etape d'hydrolyse

L'efficacité de l'étape d'hydrolyse, qui constitue le processus limitant de la réaction globale, est assurée par le résidu E268 dont le rôle majeur est d'activer et d'orienter la molécule d'eau attaquant l'intermédiaire thioacylenzyme (Marchal *et al.*, 2000). De plus, à des valeurs de pH où il est sous forme carboxylate (c-à-d pH > 7,6), il jouerait un rôle de catalyseur basique. De même, le rôle discriminant de E268 vis-à-vis de nucléophiles tels que l'hydrazine (NH₂NH₂) ou l'hydroxylamine (NH₂OH) autre que l'eau a également été montré (Marchal *et al.*, 2001). C'est ainsi que NH₂NH₂ et NH₂OH ne jouent pas le rôle d'accepteurs d'acyle mais bloquent l'étape d'hydrolyse dans le type sauvage. Par contre, en l'absence du résidu E268, ils se comportent comme des accepteurs d'acyle avec une vitesse de la réaction d'aminolyse efficace.

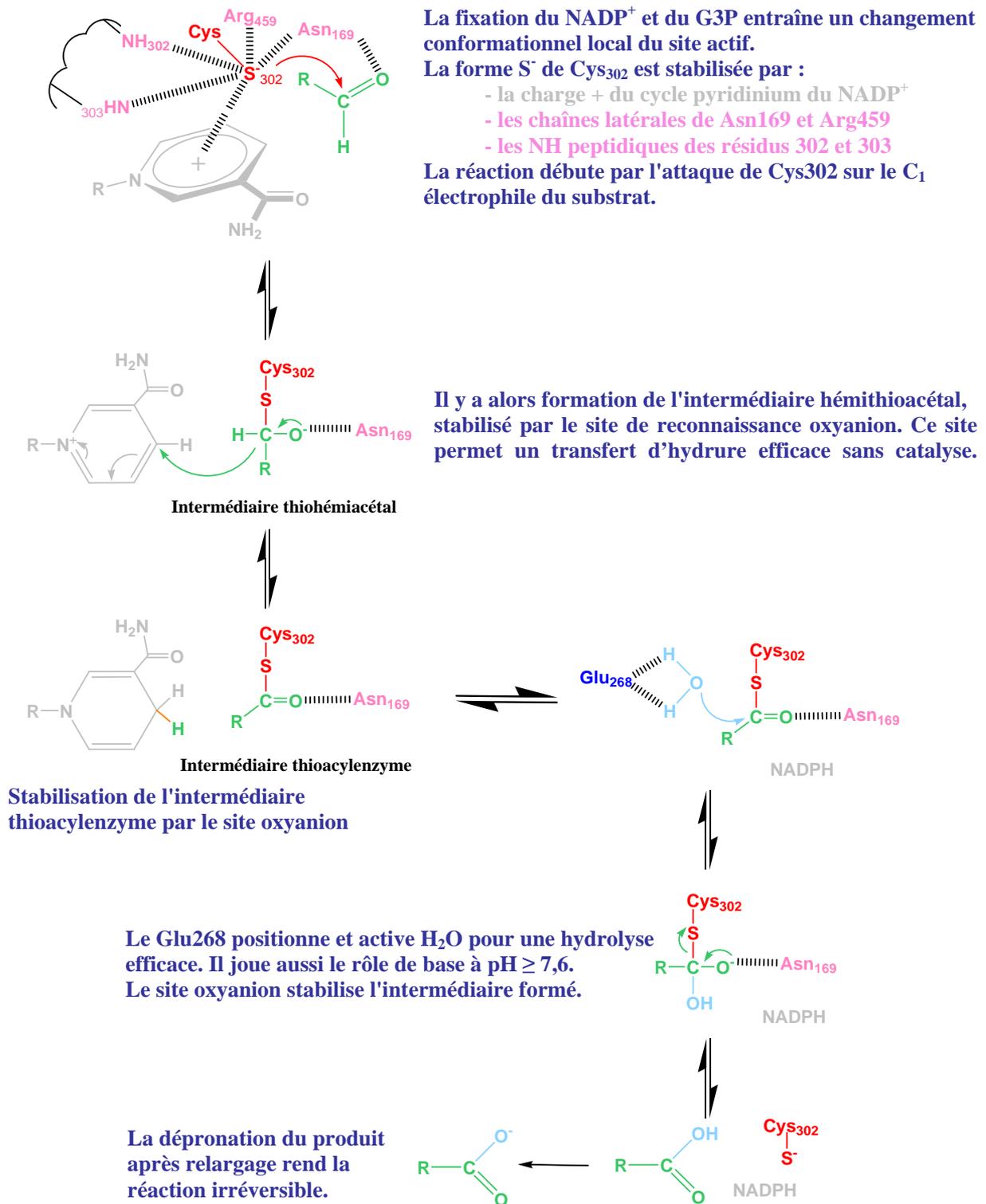


Schéma 12 : Représentation du mécanisme catalytique de la GAPN de *S. mutans* (Marchal, 2001).

3.3.2.2.3. Nécessité d'une isomérisation conformationnelle du cofacteur au cours de la catalyse

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre 3.2.2.3, la partie NMN du cofacteur NAD(P) apparaît extrêmement flexible. Deux conformations compatibles avec le mécanisme catalytique à deux étapes ont été décrites pour les ALDH de classe 1 et 2 (Moore *et al.*, 1998 ; Steinmetz *et al.*, 1997) (Figure 12).

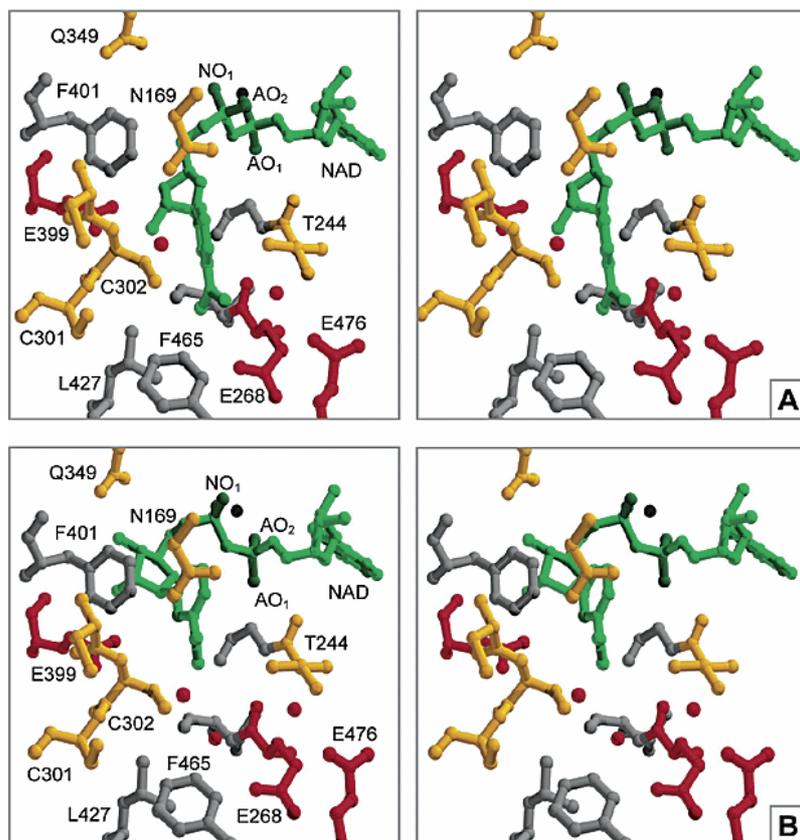


Figure 12 : Vues stéréo des configurations observées dans le site actif de l'ALDH2 humaine (d'après Perez-Miller et Hurley, 2003). (A) Conformation dite "transfert d'hydrure". (B) Conformation dite "hydrolyse". Les atomes d'oxygène du pont pyrophosphate du cofacteur sont représentés en vert foncé. Les atomes NO1 et AO2, qui interagissent avec l'ion Mn^{2+} (en noir), pointent vers l'arrière sur cette figure alors que les molécules d'eau sont représentées en rouge. Pour des raisons de lisibilité, seule la chaîne latérale du résidu N169 a été représentée.

Dans la première conformation, la partie NMN du cofacteur, et plus particulièrement le nicotinamide, occupe une position compatible avec le transfert d'hydrure ($\sim 3,5 \text{ \AA}$ de la C302 catalytique). Par contre, elle ne permettrait pas à l'étape d'hydrolyse d'avoir lieu car elle empêcherait, de par le positionnement de la partie NMNH, le résidu E268 de jouer son rôle dans cette étape (Figure 12A). Le fait que le mécanisme cinétique soit de type séquentiel ordonné implique que le cofacteur reste lié à l'enzyme pendant la totalité de l'acte catalytique.

De plus, seule la conformation dite "hydrolyse" permettait l'observation dans le site actif de l'ALDH2 d'une molécule d'eau potentiellement impliquée dans l'étape d'hydrolyse (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Hurley *et al.*, 2001). Ceci suggérait donc qu'un mouvement de la partie NMNH était un préalable à l'étape d'hydrolyse, d'où l'hypothèse que dans la seconde conformation, la partie NMNH adopte une conformation plus contractée (Figure 12B). Cette hypothèse a été confortée par la comparaison de structures cristallines de l'ALDH 2 humaine sous forme de complexes binaires avec le NAD et le NADH, qui a apporté des arguments en faveur d'une préférence conformationnelle pour les formes oxydée et réduite du NAD (Perez-Miller et Hurley, 2003).

3.3.2.3. Propriétés cinétiques particulières de certaines ALDH non phosphorylantes

3.3.2.3.1. Influence des cations métalliques sur la catalyse

Il a été montré que les cations métalliques tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} ou encore Ca^{2+} influencent de façon différente les propriétés catalytiques des trois principales ALDH isolées de mammifères. En effet, l'ajout d'ions Mg^{2+} augmente l'activité spécifique de l'ALDH de classe 2 mitochondriale (Takahashi *et al.*, 1980a ; Vallari et Pietruszko, 1984a), alors qu'il inhibe l'activité de l'enzyme de classe 1 cytosolique (Dickinson et Hart, 1982 ; Bennett *et al.*, 1983) et n'a aucun effet sur l'enzyme dimérique cytosolique de classe 3 (Lindahl et Evces, 1984 ; Wang *et al.*, 1990). Les études complémentaires de Vallari et Pietruszko (1984b) avaient permis de montrer que dans le cas de l'ALDH 1, pour laquelle la dissociation du cofacteur réduit constitue le processus limitant de la réaction globale (Blackwell *et al.*, 1987), l'effet inhibiteur des ions Mg^{2+} était la conséquence d'une liaison plus forte du NADH à l'enzyme. Par contre, pour l'ALDH 2, l'effet stimulateur est décrit être dû à une augmentation de la vitesse de dissociation du produit à partir du complexe ternaire ALDH/NADH/acide carboxylique, qui est l'étape limitante de la réaction (Weiner *et al.*, 1976). Une interprétation moléculaire et structurale de ces résultats cinétiques a pu être avancée à partir des données obtenues par radiocristallographie aux rayons X et RMN. Dans un premier temps, les structures cristallines de complexes binaires ALDH/NAD obtenues pour les ALDH de classe 1 et 2 en présence d'ions Mg^{2+} avaient révélé l'interaction de cet ion avec le pont pyrophosphate du NAD (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Moore *et al.*, 1998). Les expériences de RMN réalisées sur ces deux classes d'ALDH ont ensuite montré que l'interaction

Mg²⁺/pyrophosphate réduisait la mobilité de la partie NMNH du NADH, par rapport à la liberté conformationnelle observée de la partie NMN du NAD. Dans le cas de l'ALDH 2, elle favorisait également un changement conformationnel de la partie NMNH du NADH lui permettant d'adopter une conformation compatible avec l'étape d'hydrolyse (Hammen *et al.*, 2002). Très récemment, ces conclusions ont été affinées par l'étude détaillée de l'effet des ions Mg²⁺ sur plusieurs étapes de la réaction. En fait, ces travaux ont montré que ces ions affectaient de façon similaire les mêmes étapes pour les ALDH 1 et 2 à savoir, qu'ils n'influencent pas l'attaque nucléophile de la C302 catalytique et le transfert d'hydrure, mais conduisent à un ralentissement de la dissociation du NADH (Ho *et al.*, 2005).

3.3.2.3.2. Réactivité de demi-site

Elle a été décrite à l'origine à partir d'études faites sur l'ALDH2 ; la plus étudiée étant l'ALDH2 mitochondriale de foie humain. Il avait été proposé que les propriétés de réactivité de demi-site des ALDH de classe 2 étaient la conséquence de la non-saturation des sites de fixation du cofacteur, avec seulement deux sites occupés par tétramère. Leur description en tant qu'exemple extrême de coopérativité négative impliquait l'existence de mécanismes de communication inter-sous-unités (Ambroziak *et al.*, 1989). Cependant, aucune interprétation moléculaire et/ou structurale n'avait pu être avancée sur la base de l'inspection des structures cristallines d'ALDH2 sous forme holoenzyme. En effet, une occupation totale des sites de fixation du cofacteur était observée et aucune modification significative du positionnement des chaînes principales et latérales n'était observée entre les formes apo et holoenzymes. Par contre, des études récentes menées sur un variant protéique oriental quasiment inactif de cette ALDH, désigné par ALDH2*2, ont permis de mieux appréhender ce phénomène de réactivité de demi-site. Ce variant a été isolé pour la première fois dans les racines de cheveux d'orientaux présentant le syndrome de "flushing" (rougissement de la peau du visage) lors de la consommation d'alcool. Les personnes présentant ce variant sont hétérozygotes pour le gène codant cette protéine et sont en majeure partie d'origine asiatique (presque 50% de la population) et dans une moindre mesure d'origine maghrébine.

La substitution E487K identifiée dans ce variant conduit à une diminution du k_{cat} d'un facteur 10 par rapport à l'ALDH2 de type sauvage et à une augmentation du K_M pour le NAD d'un facteur 200 ainsi qu'à une modification de l'étape limitante de la réaction qui devient associée à l'acylation (Farres *et al.*, 1994). De plus, la même équipe avait montré que dans des formes hétérotétramériques ALDH2/ALDH2*2, les sous-unités de type oriental étaient

dominantes par rapport à celles de type sauvage, la conséquence étant une inactivation des sous-unités issues de l'ALDH2 (Wang *et al.*, 1996). La caractérisation des propriétés enzymatiques des variants chimériques générés à partir de toutes les combinaisons possibles entre sous-unités actives et inactives a permis de proposer un modèle de réactivité de demi-site pour l'ALDH2 de type sauvage dans lequel seule une sous-unité est active par dimère (Zhou et Weiner, 2000). Très récemment, la comparaison des structures cristallines de l'ALDH2 et de l'ALDH2*2 a permis d'identifier un certain nombre de facteurs structuraux potentiellement impliqués dans la communication inter-sous-unités au sein d'un même dimère et par conséquent dans le mécanisme de "dominance". Il a été montré que la substitution E487K conduit à la perte des ponts salins intra-monomère E487/R264 et inter-monomère E497/R475 et donc à une déstabilisation de l'interface entre les monomères d'un même dimère. Ceci a pour principales conséquences 1) un basculement du résidu R264 qui s'éloigne de l'interface du dimère et n'est plus capable d'établir de liaisons hydrogène avec le groupement carbonyle du résidu 469 localisé dans la boucle 463-478 du monomère adjacent, 2) la perte de toute interaction inter-monomère favorable impliquant la position 487, 3) l'absence de stabilisation de l'hélice α G impliquée dans le sous-site de reconnaissance de l'adénosine ainsi qu'une modification du positionnement du brin β 11 sous-tendant le résidu catalytique E268 et ; 4) la désorganisation de la boucle 463-478 du monomère adjacent (Larson *et al.*, 2005). Bien que cette boucle n'interagisse pas directement avec le cofacteur, sa flexibilité va conduire à une série de mouvements de chaînes principales et latérales qui vont se propager jusqu'au site de fixation du cofacteur. Les modifications vont affecter le positionnement du résidu E399 dont le rôle dans la stabilisation du ribose adjacent au nicotinamide a été montré et le résidu F401 impliqué dans la stabilisation du nicotinamide (Ni *et al.*, 1997 ; Perez-Miller et Hurley, 2003 ; voir paragraphe 3.2.2.3 page 37-39). Ces différentes observations ont conduit les auteurs à proposer que le positionnement désordonné de l'hélice α G sous-tendant le résidu R264, serait majoritairement responsable de l'augmentation de 200 fois du K_M du NAD dans le variant ALDH2*2 alors que la réorientation de la chaîne latérale du résidu E399 pourrait contribuer à la diminution du k_{cat} d'un facteur 10. Cependant, l'aspect le plus novateur de cette étude est sans doute la mise en évidence du rôle central de la boucle 463-478 dans les phénomènes de communication inter-sous-unités.

Les cations divalents ont également une influence sur la réactivité de demi-site de l'ALDH mitochondriale de foie de cheval. En effet, l'activité spécifique et le saut de

production de NADH dans l'étape d'acylation sont multipliés par deux en présence d'ions Mg^{2+} . Les expériences de sédimentation à l'équilibre réalisées par les mêmes auteurs suggèrent qu'en absence de cations divalents l'enzyme est sous forme tétramérique et présente une réactivité de demi-site, alors que l'ajout d'ions Mg^{2+} entraîne une dissociation de l'enzyme en dimères et l'obtention d'une réactivité totale des sites (Takahashi *et al.*, 1980b).

Enfin, les résultats obtenus très récemment par notre équipe sur la MSDH de *B. subtilis* ont montré que ces propriétés de réactivité de demi-site étaient également retrouvées chez les ALDH non phosphorylantes CoA dépendantes (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Cependant, elles restent à expliquer au niveau structural.

Objectifs

Une des thématiques développées par l'équipe Enzymologie Moléculaire concerne l'étude de la famille des Aldéhyde Déshydrogénases non-phosphorylantes (ALDH) à cofacteur NAD(P)⁺. Par une approche de relations structure/fonction, Stéphane Marchal avait initié ce projet par la caractérisation des facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la catalyse et la spécificité structurale de GAPN de *S. mutans*. Mon projet de thèse s'inscrit dans ce cadre et s'articule autour de trois volets.

Le premier volet concerne deux aspects fondamentaux du mécanisme catalytique des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, à savoir comment est stabilisée la partie nicotinamide du cofacteur au cours de l'étape d'acylation et quel changement conformationnel doit subir le cofacteur entre les étapes d'acylation et de désacylation. En effet, le fait que la vitesse associée à l'étape d'acylation soit supérieure à 500 s⁻¹ pour la GAPN de *S. mutans*, implique un positionnement adéquat du nicotinamide par rapport à l'intermédiaire hémithioacétal au sein du complexe ternaire pour permettre un transfert d'hydrure efficace. Par contre, le positionnement adopté par la partie NMN dans l'étape d'acylation ne peut pas permettre au résidu E268 de jouer son rôle au cours de l'étape d'hydrolyse. Le mécanisme cinétique étant de type séquentiel ordonné, une isomérisation conformationnelle du cofacteur réduit doit donc précéder l'étape d'hydrolyse.

Dans ce cadre, le premier volet de mon projet de thèse était de caractériser :

- les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la stabilisation et le positionnement adéquat du nicotinamide au cours de l'étape d'acylation,
- la conformation adoptée par le NADPH après le transfert d'hydrure.

Le second volet de mon projet concernait la caractérisation des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans l'activation et le positionnement efficace du résidu E268 dont le rôle crucial au niveau de l'étape d'hydrolyse avait été montré.

Enfin, le dernier volet de mon projet s'inscrivait dans une problématique plus générale en vue de caractériser les facteurs moléculaires impliqués dans les phénomènes de coopérativité et de réactivité de demi-site. En effet, les ALDH non phosphorylantes CoA dépendantes ou non sont des enzymes multimériques qui présentent pour nombre d'entre elles des propriétés de coopérativité ; d'où la question de l'existence de telles propriétés dans

GAPN de *S. mutans* et si le cas échéant, quelle est la nature des facteurs structuraux impliqués ?

En vue d'apporter des éléments de réponse à ces trois volets de mon projet de thèse, une approche de relation structure/fonction combinant des approches biochimiques, moléculaires et structurales a été utilisée. En particulier, le premier volet de mon projet a été mené en collaboration étroite avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy (UMR 7036 CNRS/Nancy-Université).

Résultats

Partie I :
Stabilisation et isomérisation du cofacteur

1. Rôle du résidu T244 dans l'étape d'acylation

Dans la conformation décrite comme étant compatible avec un transfert d'hydrure efficace pour les ALDH non-phosphorylantes non CoA-dépendantes, incluant GAPN de *S. mutans*, le cycle nicotinamide est positionné entre les chaînes latérales des résidus C302 et T244, chacune à $\sim 3,5$ Å du cycle. Ceci suggérerait un rôle majeur du groupement β -CH₃ de la T244, résidu invariant dans cette famille d'ALDH, dans le positionnement du nicotinamide au sein du complexe ternaire. Cette hypothèse était confortée par le fait que la conformation de la chaîne latérale du résidu T244 pouvait être stabilisée par liaison hydrogène entre son groupement β -OH et l' ϵ -NH₂ de la chaîne latérale du résidu K178, résidu conservé à plus de 75% dans les ALDH non-phosphorylantes non CoA-dépendantes (voir Figure 13). Par une approche de relation structure/fonction, nous avons donc entrepris de déterminer le rôle du résidu T244 et d'évaluer la contribution de l'interaction T244/K178 dans GAPN de *S. mutans*.

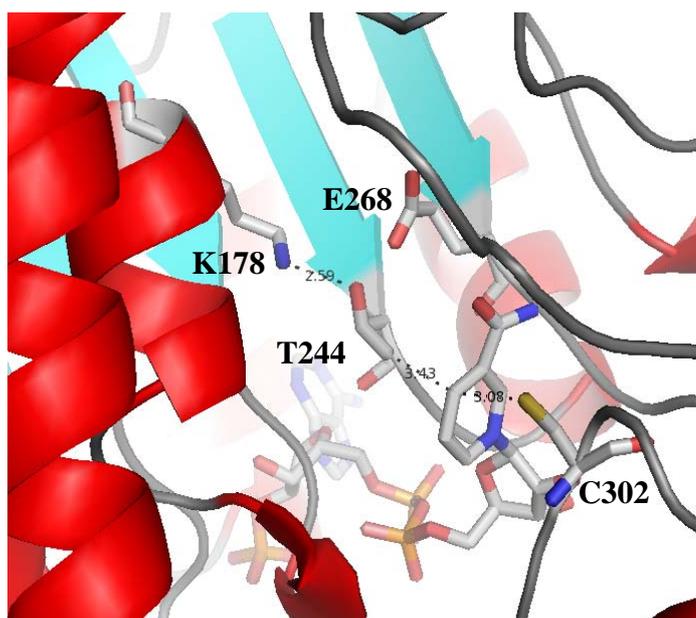


Figure 13 : Représentation schématique de l'environnement protéique autour du noyau nicotinamide du NADP dans la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi *et al.*, 1999). Les résidus T244 et E268 sont localisés à l'extrémité C-terminale d'un brin β , le résidu K178 est inclus dans une hélice α et la C302 catalytique est localisée dans une boucle.

1.1. Rôle du groupement β -CH₃ de la T244

L'introduction d'un résidu sérine en position 244 conduit à un changement d'étape limitante qui devient associée à l'étape d'acylation avec une vitesse diminuée d'un facteur

2900 par rapport au type sauvage, cette vitesse étant toujours limitée par la vitesse de transfert d'hydrure (un effet isotopique de 2,1 est observé en présence de substrat deutéré D-[1-²H]G3P). Le fait que la vitesse du transfert de l'hydrure de l'intermédiaire hémithioacétal sur le cycle nicotinamidium du NADP soit fortement diminuée était en faveur d'un positionnement non efficace du cycle nicotinamide par rapport à l'intermédiaire hémithioacétal au sein du complexe ternaire covalent. Une telle hypothèse est confortée par l'étude de la variation de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation en fonction du pH. En effet, nos résultats montrent que le pK_{app} de la C302 est de 6,8 dans le complexe ternaire du mutant T244S alors qu'il est de 6,2 dans le type sauvage. Cette différence de pK_{app} de la C302 dans le complexe michaelien, qui précède la formation du complexe ternaire covalent, peut être interprétée comme la conséquence d'un positionnement relatif nicotinamide/C302 différent de celui existant dans le complexe michaelien du type sauvage.

Pour valider une telle hypothèse, une approche structurale par diffraction aux rayons X, en collaboration avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy, a été entreprise afin d'obtenir des informations sur le positionnement du cycle nicotinamide du NADP dans le mutant T244S. Dans ce contexte, seule la structure d'un complexe binaire T244S-GAPN/NADP pouvait être déterminée. En effet, la nature transitoire de l'intermédiaire hémithioacétal rendait impossible la détermination de la structure tridimensionnelle d'un complexe ternaire T244S-GAPN/NADP/intermédiaire hémithioacétal et empêchait donc de pouvoir accéder au positionnement du cycle nicotinamide dans le complexe ternaire covalent. L'examen de la structure cristalline du complexe binaire T244S-GAPN/NADP montre que l'absence du groupement β -CH₃ conduit à une conformation stabilisée de la portion NMN du cofacteur, clairement différente de celle supposée être adoptée dans le complexe ternaire covalent (ALDH/GAPN)/NAD(P)/intermédiaire hémithioacétal de l'enzyme sauvage. En particulier, le cycle nicotinamide est maintenant stabilisé par des interactions de Van der Waals supplémentaires avec les résidus P167 et L174. Ceci étant, reste posée la question de savoir si la conformation du cycle nicotinamide observée dans la structure du complexe binaire peut être considérée comme représentative de celle adoptée dans le complexe ternaire covalent. Avec les données structurales disponibles, il n'est pas possible de répondre à cette question. Il peut être noté que la structure tridimensionnelle du complexe binaire obtenue montre une fixation du cofacteur qui ne conduit ni à l'activation de la C302 (présentant un pK_{app} de 9 et une grande accessibilité vis-à-vis de sonde chimique spécifique des cystéines telle que le 2,2'-dithiopyridine), ni à la cassure du pont salin E268⁻/R459⁺ qui se produit lorsque le substrat G3P se fixe.

1.2. Rôle du groupement β -OH de la T244

La substitution T244V modifie de façon drastique les propriétés catalytiques de l'enzyme. L'étape limitante de la réaction devient associée à l'acylation et son efficacité est diminuée de respectivement $2,5 \cdot 10^5$ et 86 fois par rapport au type sauvage et au mutant T244S. Bien que la très faible valeur de k_{cat} ($2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) n'ait pas permis de déterminer si l'étape cinétiquement limitante au sein de l'acylation était toujours associée au transfert d'hydrure, il est probable que la rupture de la liaison hydrogène entre les résidus en position 244 et 178 soit responsable de la forte diminution du k_{cat} en conduisant à la formation d'un complexe ternaire non efficace. Cependant, il n'est pas possible d'exclure la possibilité que des perturbations structurales, induites par la présence d'un résidu valine dans l'environnement polaire de cette région du site actif de GAPN, puissent également y contribuer.

L'introduction d'un résidu alanine en position 178 s'est révélée informative et complémentaire des études réalisées sur le mutant T244S. En fait, les mutants K178A et T244S présentent des propriétés catalytiques similaires. Comme pour le mutant T244S, l'étape d'acylation est devenue limitante. L'effet isotopique de 2,1 observé en présence de substrat deutéré D-[1- ^2H]G3P montre qu'au sein de cette étape, le processus cinétiquement limitant reste associé au transfert d'hydrure. Par contre, son efficacité est diminuée d'un facteur $2,5 \cdot 10^4$ par rapport au type sauvage. De plus, le $\text{p}K_{\text{app}}$ de la C302 dans les deux complexes ternaires est équivalent à savoir 6,7 contre 6,8. Il était donc tentant de proposer une interprétation des résultats semblable à celle développée pour le mutant T244S. Ainsi, la rupture de la liaison hydrogène K178/T244 engendrée par les substitutions T244V ou K178A conduirait à une modification du positionnement du groupement β -CH₃ du résidu en position 244, et par conséquent du noyau nicotinamide, qui pourrait expliquer la très faible efficacité du transfert d'hydrure.

En conclusion, nos résultats suggèrent fortement que le rôle essentiel du groupement β -CH₃ du résidu T244, dont le positionnement est conditionné par la liaison hydrogène K178/T244, est de permettre au noyau nicotinamide d'adopter une conformation adaptée à un transfert d'hydrure efficace au cours de l'étape d'acylation. Ce résidu étant invariant dans les ALDH non-phosphorylantes non CoA-dépendantes, il est raisonnable d'étendre nos conclusions à l'ensemble de cette famille d'ALDH, tout au moins à celles ne contenant pas de Mg^{++} (voir partie Discussion/Perspectives).

Publication 1 :

"Invariant T244 is essential for efficient acylation step of the nonphosphorylating Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*"

Invariant Thr²⁴⁴ is essential for the efficient acylation step of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*

Arnaud PAILLOT*, Katia D'AMBROSIO†‡, Catherine CORBIER†, François TALFOURNIER*¹ and Guy BRANLANT*¹

*MAEM, UMR 7567 Nancy-Université, CNRS, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France, †LCM3B, Groupe Biocristallographie, UMR 7036 Nancy-Université, CNRS, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France, and ‡Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, 80134 Napoli, Italy

One of the most striking features of several X-ray structures of CoA-independent ALDHs (aldehyde dehydrogenases) in complex with NAD(P) is the conformational flexibility of the NMN moiety. However, the fact that the rate of the acylation step is high in GAPN (non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) from *Streptococcus mutans* implies an optimal positioning of the nicotinamide ring relative to the hemithioacetal intermediate within the ternary GAPN complex to allow an efficient and stereospecific hydride transfer. Substitutions of serine for invariant Thr²⁴⁴ and alanine for Lys¹⁷⁸ result in a drastic decrease of the efficiency of hydride transfer which becomes rate-limiting. The crystal structure of the binary complex T244S GAPN–NADP shows that the absence of the β -methyl group leads to a well-defined conformation of the NMN part, including the nicotinamide ring, clearly different from that depicted to be

suitable for an efficient hydride transfer in the wild-type. The ~ 0.6 -unit increase in pK_{app} of the catalytic Cys³⁰² observed in the ternary complex for both mutated GAPNs is likely to be due to a slight difference in positioning of the nicotinamide ring relative to Cys³⁰² with respect to the wild-type ternary complex. Taken together, the data support a critical role of the Thr²⁴⁴ β -methyl group, held in position through a hydrogen-bond interaction between the Thr²⁴⁴ β -hydroxy group and the ϵ -amino group of Lys¹⁷⁸, in permitting the nicotinamide ring to adopt a conformation suitable for an efficient hydride transfer during the acylation step for all the members of the CoA-independent ALDH family.

Key words: acylation step, aldehyde dehydrogenase (ALDH), hydride transfer, nicotinamide conformation, *Streptococcus mutans*, X-ray structure.

INTRODUCTION

Non-phosphorylating ALDHs (aldehyde dehydrogenases) belong to a family of phylogenetically and structurally related enzymes that catalyse the NAD(P)-dependent oxidation of a wide variety of aldehydes to their corresponding non-activated or CoA-activated acids. ALDHs are known to participate in many biological functions, such as intermediary metabolism, detoxification, osmotic protection and cellular differentiation. They share a similar chemical mechanism involving two major steps: first, an acylation step common to both families and, second, a deacylation step that differs by the nature of the acyl acceptor. The acylation step involves the formation of a thiohemiacetal intermediate via nucleophilic attack of the catalytic Cys³⁰² on the aldehydic function followed by an oxidoreduction process leading to the formation of a thioacylenzyme intermediate and NAD(P)H. (The amino acid numbering used for the biochemical and structural data is that defined by Wang and Weiner [1], and this nomenclature has been used for all biochemical studies performed on members of the ALDH family.) The deacylation step includes the nucleophilic attack of a water or CoA molecule on the thioacylenzyme intermediate and release of the non-activated or CoA-activated acids. Moreover, previous studies have highlighted major differences in the kinetic mechanism of ALDHs depending upon the nature of the deacylation step. In CoA-independent ALDHs, kinetic data support an ordered sequential mechanism in which

NAD(P)H dissociates last [2,3], whereas CoA-dependent ALDHs exhibit a Ping Pong mechanism in which the release of the reduced cofactor occurs before the *trans*-thioesterification step [4,5].

Mechanistic aspects were studied extensively for CoA-independent ALDHs, and several invariant residues were shown to be critical for the chemical mechanism [1,6–8]. In addition, evidence has been provided for the chemical activation of catalytic Cys³⁰² upon cofactor binding to GAPN (non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) from *Streptococcus mutans* through a local conformational rearrangement which has been shown to be strongly kinetically favoured by substrate binding to the binary complex GAPN–NADP [9]. Moreover, enzymatic and structural studies on GAPN and other ALDHs have highlighted the essential roles of: (i) an oxyanion hole composed of the side chain of invariant Asn¹⁶⁹ and the main-chain nitrogen of Cys³⁰² that allows an efficient hydride transfer without base catalyst assistance [10–13], and (ii) invariant Glu²⁶⁸ in the rate-limiting hydrolysis step through activation and orientation of the attacking water molecule [2]. Additionally, numerous crystal structures of CoA-independent ALDHs have already been solved in the presence of NAD(P). One of the most striking features of many ALDH structures is the conformational flexibility of the NMN moiety of the cofactor, which is seen as having missing or weak electron density (see, e.g., [11,14–15]). However, two discrete conformations, compatible with the two-step catalytic mechanism, were described for class 1 and class 2 ALDHs [10,16]. In the

Abbreviations used: ALDH, aldehyde dehydrogenase; GAPN, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; 2PDS, 2,2'-dipyridyl disulfide; r.m.s.d., root mean square deviation.

¹ Correspondence may be addressed to either of these authors (email francois.talfournier@maem.uhp-nancy.fr or guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr).

Co-ordinates and structural factors for T244S mutant GAPN (non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) have been deposited in the Protein Data Bank under accession code 2ID2.

first conformation, the NMN moiety, in particular that of the nicotinamide ring, occupies a position suitable for hydride transfer, but not for deacylation because it would sterically exclude catalytic Glu²⁶⁸ from playing its role in the hydrolytic process. The fact that the cofactor remains bound to the enzyme along the two-step catalytic mechanism, strongly suggested that movement of the reduced NMN (NMNH) is a prerequisite for completion of the second half of the reaction. The second conformation in which the NMN moiety adopts a contracted position was hypothesized to be suitable for hydrolysis. This view was supported by comparison of human ALDH2 structures in complex with either NAD or NADH, which provided arguments in favour of a conformational preference for the oxidized and reduced cofactors [17]. Recently, the first structural evidence for a conformational isomerization of the cofactor during the catalytic cycle of CoA-independent ALDH was put forward by the crystal structure of a GAPN thioacylenzyme intermediate–NADPH complex [18]. This structure revealed that the reduced cofactor adopts a new conformation with a flip of the NMNH moiety which has been proposed to be suitable for the deacylation step for all members of the CoA-independent ALDH family. In contrast, the key question about the positioning of the nicotinamide ring during the acylation step and the structural factors involved remains to be addressed. In the case of GAPN from *S. mutans*, inspection of the three-dimensional structure of the binary complex GAPN–NADP revealed a poorly defined electron density around the NMN portion. The fact that the rate of the acylation step is high ($> 500 \text{ s}^{-1}$) is, however, indicative of a defined positioning of the nicotinamide ring relative to the transient hemithioacetal intermediate competent for an efficient hydride transfer [2]. In the conformation depicted to be suitable for an efficient hydride transfer in CoA-independent ALDHs, including GAPN, the nicotinamide ring is positioned between Cys³⁰² and the β -methyl group of the invariant Thr²⁴⁴ residue, each at a distance of $\sim 3.5 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$) from the ring [10,11,17]. This suggested a major role of the β -methyl group of Thr²⁴⁴ in the positioning of the nicotinamide ring within the covalent ternary complex. Such an assumption is also supported by the fact that the Thr²⁴⁴ side chain could be held in position through hydrogen-bond interaction between its β -hydroxy group and the ϵ -amino group of Lys¹⁷⁸, a residue highly conserved in all known primary structures of CoA-independent ALDHs.

In the present study, the catalytic properties of the T244S, T244V and K178A mutated GAPNs were determined. These substitutions result in a drastic effect on the acylation step, which becomes rate-limiting for the overall reaction in contrast with the wild-type for which the deacylation step is rate-limiting. Moreover, the crystal structure of a binary complex T244S GAPN–NADP shows that the NMN moiety of the NADP molecule is now well defined in the electron-density maps. The nicotinamide ring adopts a unique conformation clearly different from that hypothesized to be operative in the ALDH–GAPN acylating ternary complex [10,15–17]. Taken together, these results support a critical role of Thr²⁴⁴, in particular of its β -methyl group, in permitting the nicotinamide ring to adopt a conformation suitable for efficient hydride transfer. All the results are discussed in relation to available data on the CoA-independent ALDH family and for their relevance to the two-step catalytic mechanism.

EXPERIMENTAL

Production and purification of mutated GAPNs from *S. mutans*, and materials

T244S, T244S/C382S, T244V and K178A mutated GAPNs were produced as described previously [9]. For purification, cells

were harvested by centrifugation at 3000 *g* for 20 min, resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2 (buffer A) and disrupted by sonication for 5 min using a Branson Sonifier 250. The extract was clarified by centrifugation at 15 000 *g* for 90 min, and solid ammonium sulfate was added to either 40 % saturation for T244S and T244S/C382S GAPNs or 30 % saturation for T244V and K178A. The precipitate was removed by centrifugation at 15 000 *g* for 90 min, and the supernatant was applied to a high-performance phenyl-Sepharose column using a FPLC system (Amersham Biosciences) equilibrated previously with buffer A containing 1 M ammonium sulfate. Following equilibration, mutated GAPNs were eluted using a descending gradient (1–0 M) of ammonium sulfate at $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Fractions containing mutated GAPNs were pooled, concentrated and dialysed exhaustively against buffer A and applied to a Q-Sepharose column equilibrated with buffer A. After washing with buffer A, mutated GAPNs were eluted using a 0–1 M KCl gradient at $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. At this stage, mutated GAPNs were considered to be pure as judged by SDS/7.5 % PAGE and by electrospray-MS analysis. T244V and K178A GAPNs were isolated as apo forms, whereas 0.8 mol of NADP remained bound per tetramer of T244S and T244S/C382S GAPNs. Enzyme concentrations were determined spectrophotometrically as the apo form by using a molar absorption coefficient of $2.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm [9] and are expressed in molarity. All other materials were reagent-grade or better and were used without further purification. NADP (Roche) was dissolved in water, and the stock concentration was determined spectrophotometrically by using a molar absorption coefficient of $18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 259 nm. D,L-G3P (G3P is glyceraldehyde 3-phosphate) or D-G3P (Sigma) was obtained by hydrolysing D,L-G3P diethyl acetal or D-G3P diethyl acetal respectively, according to the manufacturer's instructions, and its concentration was assessed enzymatically using wild-type GAPN.

Quantification of NADP content

The NADP content of purified GAPNs was quantified enzymatically after addition of 0.2 mM D,L-G3P to 1.25 μM GAPN by following the appearance of NADPH on a SAFAS flx spectrofluorometer. Fluorescence measurements were carried out in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 8.2. The excitation wavelength was set at 358 nm, and spectra were recorded in the range 380–540 nm. Maximum emission intensity was observed at 460 nm.

Steady-state kinetic analyses

Initial rate measurements were carried out on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the appearance of NADPH at 340 nm. Determination of the kinetic parameters was carried out at the optimum pH of 8.2 in 50 mM Tes buffer and 5 mM 2-mercaptoethanol. The temperature of the solutions was maintained at 25 °C by thermostatically controlled sample holders using a circulating water bath for all measurements. Catalytic constants k_{cat} and K_{m} were determined by measuring steady-state velocity at various D,L-G3P and NADP concentrations under conditions where no inhibitory effect was observed either with NADP or D,L-G3P. Data were plotted according to the Michaelis–Menten equation using least-squares regression analysis.

Deuterium isotope effects

D-[1-²H]G3P was prepared as described previously [19] and its concentration was determined enzymatically. Isotopic effects on T244S and K178A GAPNs were measured in 50 mM Tes buffer, pH 8.2, and 5 mM 2-mercaptoethanol by direct comparison of the initial velocities measured with D-G3P and D-[1-²H]G3P at

concentrations of 0.1 and 0.2 mM for both mutated GAPNs in the presence of NADP at 25 °C.

pH-dependence of the steady-state rate constant of K178A and T244S GAPNs

The pH-dependence of the steady-state rate constant, k_{cat} , which was shown to be associated with the rate-limiting acylation step (see the Results section), was studied over the pH range 5.25–8.75 or 5.25–9.00 in a mixed reaction buffer consisting of 120 mM Tris, 30 mM imidazole and 30 mM ethanoic (acetic) acid (pH-adjusted with NaOH or HCl), adjusted with 3 M NaCl to a constant ionic strength of 0.15 M. The apparent $\text{p}K_{\text{a}}$ parameters governing the pH-dependence of k_{cat} were extracted from k_{obs} against pH profiles and analysed as described by Marchal and Branlant [9].

Kinetic reactions with 2PDS (2,2'-dipyridyl disulfide)

Owing to the high reactivity of cysteine residues in all mutated GAPNs, kinetic measurements were carried out on a SX18MV-R Applied Photophysics stopped-flow apparatus (Leatherhead) at 25 °C, under pseudo-first-order conditions in 30 mM ethanoic acid, 30 mM imidazole and 120 mM Tris buffer at a constant ionic strength of 0.15 M over the pH range 5.50–8.75 for T244S and T244/C382S GAPNs and 5.75–9.25 for K178A GAPN. The pH range was used to study the pH stability of the mutated GAPNs. One syringe contained the apo or apo-like form of GAPN, and the other contained 2PDS. (In contrast with the term 'holo form', the term 'apo-like form' indicates here an apo form saturated by NADP but in which the cofactor has not yet induced the local conformational rearrangement of the active site, including the decrease of the $\text{p}K_{\text{a}}$ of Cys³⁰² and the loss of the salt-bridge between Glu²⁶⁸ and Arg⁴⁵⁹ [9,15].) The reaction was monitored at 343 nm with 2.5 μM GAPN and 200 μM 2PDS and pyridine-2-thione was quantified using an molar absorption coefficient of 8080 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The pseudo-first-order k_{obs} values were determined at each pH by fitting the absorbance A at 343 nm against time t to a monophasic expression (eqn 1):

$$A_{343} = a(1 - e^{-k_{\text{obs}} \times t}) + c \quad (1)$$

where k_{obs} is the observed rate constant, a is the burst magnitude and c represents the value of the ordinate intercept, or to a biphasic expression (eqn 2):

$$A_{343} = a_1(1 - e^{-k_{\text{obs}1} \times t}) + a_2(1 - e^{-k_{\text{obs}2} \times t}) + c \quad (2)$$

where $k_{\text{obs}1}$ and $k_{\text{obs}2}$ are the observed rate constants for the fast and the slower phase respectively, a_1 and a_2 are the relative amplitude values for the two phases, and c represents the value of the ordinate intercept.

The second-order rate constants, k_2 , were determined at each pH value and data were analysed as described by Marchal and Branlant [9].

Crystallization, data collection and processing

Crystals of the T244S GAPN with NADP were obtained using the hanging-drop vapour-diffusion method at 293 K. A 2–6 μl volume of a 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ protein solution in 50 mM imidazole buffer at pH 6.8 was mixed with 1–2 μl of reservoir solution composed of 1.9–2.0 M ammonium sulfate, 0.1 M Hepes buffer, pH 7.5, and 2% PEG [poly(ethylene glycol)] 400 [12,15]. The crystals grew within a few days. A 2.50 Å resolution data set was collected at 100 K at the synchrotron source in Trieste. The crystals belong

Table 1 Data collection and refinement statistics

Values in parentheses refer to the outermost resolution shell.

(a) Data collection	
Parameter	Value
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i> (Å)	143.7
<i>b</i> (Å)	154.4
<i>c</i> (Å)	115.0
<i>Z</i>	4
Resolution (Å)	2.5 (2.59–2.50)
Temperature (K)	100
Total reflections	323 307
Independent reflections	78 424
Completeness (%)	88.2 (90.1)
<i>R</i> -sym	10.4 (37)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11.7 (4.5)
(b) Refinement	
Parameter	Value
<i>R</i> -factor (%)	17.6
<i>R</i> -free (%)	22.7
R.m.s.d. from ideal geometry:	
Bond lengths (Å)	0.005
Bond angles (°)	1.26
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	
Main chain	24.3
Side chains	27.9
Water molecules	26.4
NADP (AMP moiety)	28.98
NADP (NMN)	32.87

to the space group P2₁2₁2, with unit cell dimensions $a = 143.7$ Å, $b = 154.4$ Å and $c = 115.0$ Å. Diffracted data were processed using the HKL crystallographic data reduction package [20]. Statistics of the data set are summarized in Table 1.

Phasing, refinement and quality of the model

The structure of T244S GAPN was solved by difference Fourier techniques, using the wild-type apo-like structure as a starting model (PDB code 2EUH) [15].

Several cycles of rigid-body refinement carried out with CNS [21] led to a decrease in the crystallographic *R*-factor and *R*-free values to 0.23 and 0.28 respectively. The analysis of the ($2F_o - F_c$) electron-density map at this stage of refinement was very well defined for all the structure, including the mutated residue. The ordered water molecules were added automatically and checked individually. Moreover, seven sulfate ions were added (one in each of the A and C monomers, two in the B monomer and three in the D monomer) and refined with occupancy factors ranging from 0.5 to 1. After refinement (CNS) and manual rebuilding (TurboFrodo; Silicon Graphics) the final crystallographic *R*-factor and *R*-free values calculated for the 78 424 independent reflections (in the 20.00–2.50 Å resolution range) were 0.176 and 0.227 respectively. The stereochemical quality of the model was assessed using PROCHECK [23]. The most favoured and additionally allowed regions of the Ramachandran plot contained 99.6% of the non-glycine residues. The final model consisted of 14 362 non-hydrogen atoms, 1109 water molecules and seven sulfate ions coming from the crystallization solution. The refined structure presented a good geometry with r.m.s.d. (root mean square deviation) from ideal bond lengths and angles of 0.005 Å and 1.26° respectively. The average temperature factor (*B*) for all atoms was 24.6 Å².

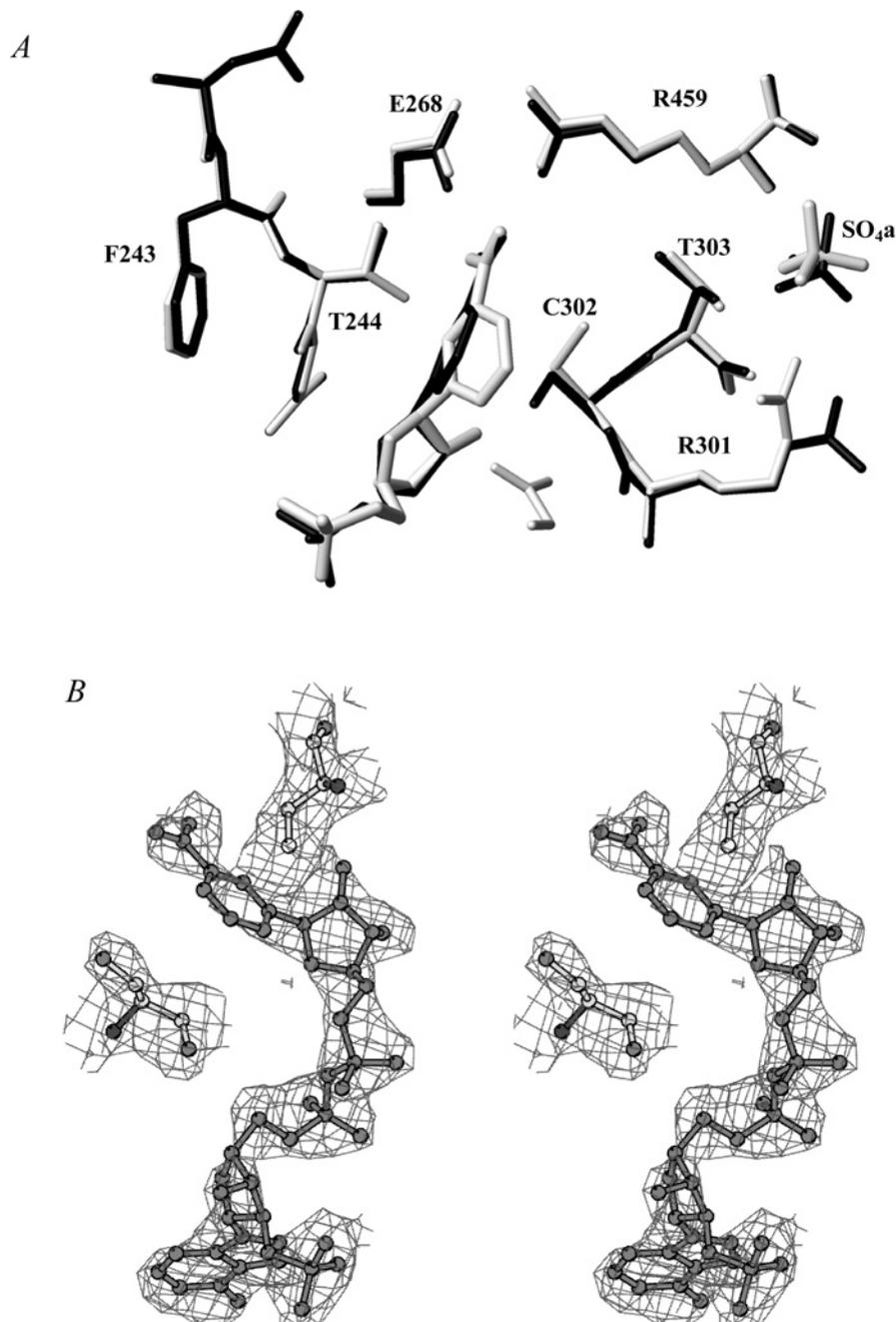


Figure 1 Active site of T244S GAPN

(A) Superimposition of the active-site regions of the apo-like wild-type enzyme (in grey) and of the T244S GAPN (in black). The conformation of the NMN moiety in the wild-type structure is the one described to be suitable for efficient hydride transfer [9,17]. Single letter amino acid codes are used. (B) Stereo view of the cofactor molecule in the $(2F_o - F_c)$ electron-density map (contour level: 1σ).

The statistics for refinement and model geometry are summarized in Table 1. Figure 1(A) was drawn using MOLMOL [24] and Figure 1(B) with BOBSCRIPT [25]

RESULTS

Rationale for the mutations

As indicated in the Introduction, we have postulated that Thr²⁴⁴ and its potential interaction with Lys¹⁷⁸ could be critical in the correct positioning of the NMN moiety of the cofactor during acyl-

ation, so that hydride transfer can occur with an optimum efficiency. In order to validate this assumption, the roles of Thr²⁴⁴ and Lys¹⁷⁸ have been probed by site-directed mutagenesis. Introduction of a residue such as serine at position 244 would provide experimental support for the role of the van der Waals interaction between the β -methyl group of Thr²⁴⁴ and the nicotinamide ring, whereas T244V and K178A substitutions would assess the role of the Lys¹⁷⁸/Thr²⁴⁴ hydrogen-bond interaction in the correct positioning of the β -methyl group of Thr²⁴⁴ relative to the nicotinamide ring of the cofactor. In the apo and apo-like forms of GAPN, Cys³⁰² and Cys³⁸² were shown previously to be reactive towards 2PDS

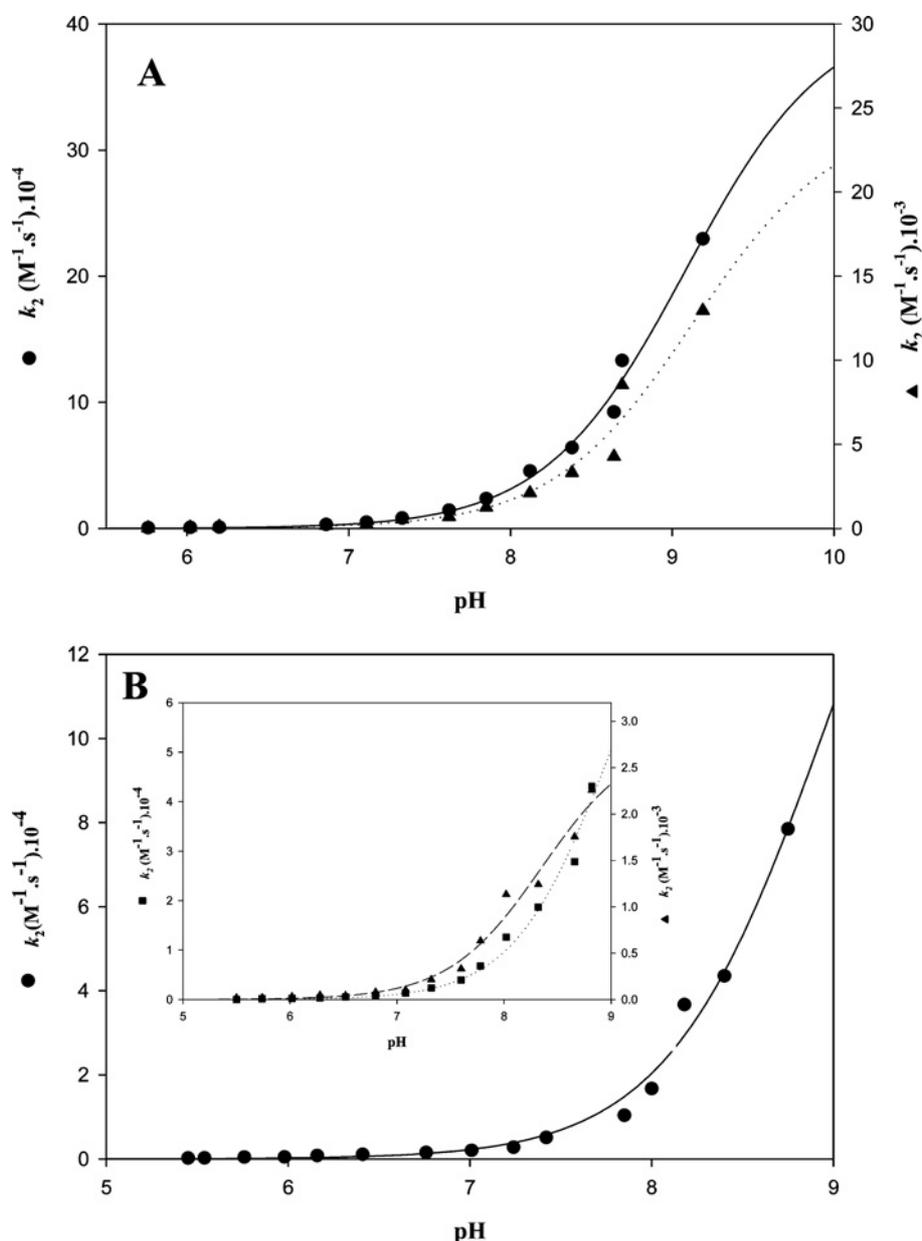


Figure 2 pH-dependence of the second-order rate constant, k_2 , for the reaction of 2PDS with apo K178A and apo-like T244S and T244S/C382S GAPNs

Kinetics were determined at 25 °C as indicated in the Experimental section. The GAPN and 2PDS concentrations were 2.5 μM and 200 μM respectively. Rate constants, k_{obs} , were determined using non-linear regression analysis, and second-order rate constants, k_2 , were calculated by dividing the k_{obs} values by the concentration of 2PDS. Transients obtained on the apo K178A and apo-like T244S GAPNs were analysed according to eqn (2), reflecting the contribution of Cys³⁰² and Cys³⁸². Transients obtained on the apo-like T244S/C382S GAPN were analysed according to eqn (1). (A) Apo K178A GAPN: both data sets were fitted against a single $\text{p}K_{\text{a}}$ model, which provided $\text{p}K_{\text{app}}$ values of 8.80 and 9.15, and k_2 values of $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (●) and $3.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (▲) respectively. (B) Main panel: data sets obtained on the apo-like T244S/C382S GAPN were fitted against a single $\text{p}K_{\text{a}}$ model, which provided $\text{p}K_{\text{app}}$ and k_2 values of 9.0 and $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectively. Inset: data sets obtained on the apo-like T244S GAPN were fitted against a single $\text{p}K_{\text{a}}$ model, which provided $\text{p}K_{\text{app}}$ values of 8.50 and 9.00 and k_2 values of $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (▲) and $9.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (■) respectively. S.E.M. on each experimental point was less than 5%.

[9]. Therefore, to assign $\text{p}K_{\text{app}}$ and k_2 values to Cys³⁰² in the apo-like form of T244S GAPN, Cys³⁸² has been replaced by a serine residue.

Determination of the $\text{p}K_{\text{app}}$ values and reactivities of the cysteine residues in the apo form of K178A GAPN and apo-like forms of K178A, T244S and T244S/C382S GAPNs with 2PDS

For all mutated GAPNs, the reaction with 2PDS under native conditions obeyed pseudo-first-order kinetics with formation of 2 mol

of pyridine-2-thione per subunit as determined from the A_{343} value, except that only 1 mol of 2PDS reacted per subunit of T244S/C382S GAPN. This is in agreement with what was described for the wild-type in which two residues, i.e. Cys³⁰² and Cys³⁸² were shown to be reactive per monomer [9]. For the K178A GAPN apo form, the two cysteine residues exhibited distinct k_2 constants. The pH- k_2 profile for each thiolate showed sigmoidal behaviour with $\text{p}K_{\text{app}}$ values of 8.80 and 9.15 and k_2 values of $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $3.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectively (Figure 2A and Table 2). The high k_2 values indicated that both cysteine residues are

Table 2 Parameters for the pH-dependence of the second-order rate constants for the reaction of 2PDS with K178A, T244S and T244S/C382S GAPNs

The experimental conditions are described in the Experimental section. Transients obtained on the apo and apo-like K178A and apo-like T244S GAPN were best described by a double-exponential expression reflecting the contribution of Cys³⁰² and Cys³⁸² and data were analysed according to eqn (2). For the apo-like T244S/C382S GAPN, experimental data were best described by a mono-exponential expression according to eqn (1). The second-order rate constants at each pH were fitted to a monosigmoidal equation to determine the p*K*_{app} values in Sigmaplot (SPSS). The error estimates are those provided by the program. ND, not determined.

GAPN	<i>k</i> ₂ (M ⁻¹ · s ⁻¹)	p <i>K</i> _{app}
Apo-GAPNs		
Wild-type*	1350 ± 28	8.84 ± 0.04
C382A*	225 ± 9	8.49 ± 0.07
C302A*	588 ± 14	9.07 ± 0.02
K178A	(3.30 ± 0.25) × 10 ⁵	8.80 ± 0.07
	(3.05 ± 0.25) × 10 ⁴	9.15 ± 0.15
Holo-GAPN		
Wild-type*	>2 × 10 ⁵	ND
Wild-type†	182 ± 2	6.1 ± 0.2
Apo-like-GAPNs‡		
K178A§	(3.0 ± 0.1) × 10 ⁵	8.85 ± 0.05
	(2.9 ± 0.2) × 10 ⁴	9.25 ± 0.05
T244S§	(3.0 ± 0.3) × 10 ³	8.5 ± 0.1
	(9.5 ± 2) × 10 ⁴	9.0 ± 0.2
T244S/C382S§	(2.0 ± 0.4) × 10 ⁵	9.0 ± 0.1

* From [9].

† This p*K*_{app} value of 6.1 for Cys³⁰² was determined using iodoacetamide as a kinetic probe (from [9]).

‡ Apo-like forms refer to GAPN/NADP binary complexes after incubation at 4 °C of the apo forms (or partially apo forms in the case of T244S and T244S/C382S GAPNs) in the presence of saturating concentration of NADP for 5 h at pH 5.5 under conditions where the conformational rearrangement occurred in the wild-type enzyme (from [9]) but not in the mutated GAPNs.

§ Although no additional experimental data can be obtained beyond the inflection point of the curves, non-linear regression analysis provides accurate p*K*_a values.

accessible within the active site of K178A GAPN, in contrast with what was observed for the wild-type apo form [9]. The high accessibility of Cys³⁰² is probably not catalytically relevant, but rather is another example of the great conformational flexibility exhibited by this residue within the active site [9,26]. The apo form of K178A GAPN incubated at 4 °C in the presence of saturating concentrations of NADP for 5 h at pH 5.5 under conditions where the conformational rearrangement of the active site was shown to occur in the apo wild-type, displayed a similar pH-*k*₂ profile to that described for the apo K178A GAPN with p*K*_{app} values of 8.85 and 9.25 and *k*₂ values of 3.0 × 10⁵ and 2.9 × 10⁴ M⁻¹ · s⁻¹ respectively (curves not shown, see Table 2). Since the apo form of T244S GAPN could not be obtained irrespective of the experimental procedure used (results not shown), titration by 2PDS was only performed on the apo-like form of T244S GAPN after incubation for 5 h at 4 °C and pH 5.5 in the presence of saturating concentrations of NADP. A pH-*k*₂ profile similar to that of apo and apo-like forms of K178A GAPN was obtained with p*K*_{app} values of 8.5 and 9.0 and *k*₂ values of 3 × 10³ and 9.5 × 10⁴ M⁻¹ · s⁻¹ respectively (Figure 2B, inset, and Table 2). The pH-*k*₂ curve of the apo-like form of T244S/C382S GAPN fitted only to a monosigmoidal profile with a p*K*_{app} value of 9.0 and a *k*₂ value of 2 × 10⁵ M⁻¹ · s⁻¹ (Figure 2B and Table 2). Such a result strongly suggests that the p*K*_{app} of 9.0 determined in the T244S GAPN represents that of Cys³⁰².

Kinetic properties of T244S, T244V and K178A GAPNs

In a previous study, it was shown that acylation and deacylation steps of wild-type GAPN could be kinetically resolved and that

Table 3 Kinetic parameters of the acylation step for the T244S, T244V and K178A GAPNs

Initial velocities of the reaction catalysed by mutated GAPNs were measured in 50 mM Tris buffer, pH 8.2, and 5 mM 2-mercaptoethanol at 25 °C. Previous enzyme activity measurements with either D,L-G3P or D-G3P showed that both enantiomeric forms equally behaved as efficient substrates for the wild-type GAPN [2]. Therefore D,L-G3P was used as a substrate for mutated GAPN-catalysed reactions. *K*_m values for NADP and D,L-G3P were determined by fitting the experimental data to the Michaelis–Menten equation.

GAPN	NADP <i>K</i> _m (μM)	D,L-G3P <i>K</i> _m (μM)	<i>k</i> _{cat} (s ⁻¹)	Rate-limiting step
Wild-type*	25 ± 2*	490 ± 50*	790 ± 20*	Deacylation
T244S	10 ± 3	120 ± 14	0.27 ± 0.03	Acylation
T244V	–	–	~0.002†	Acylation
K178A	70 ± 6	12 ± 5‡	0.020 ± 0.002	Acylation

* Corresponding to rate constant and *K*_m values for the cofactor and the substrate in the acylation step and determined with D-G3P [2]. Substrate inhibition was described to be observed for [D-G3P] > 200 μM (see [2]). The acylation rate constant was determined at 10 °C. Therefore, to compare the *k*_{cat} values of the mutated GAPNs and *k*_{ac} value of the wild-type GAPN, the reported *k*_{ac} value of the wild-type was extrapolated from the value measured at 10 °C, assuming a 2.5-fold increase of the rate constant *k*_{ac} per 10 °C (from [2]).

† The *k*_{cat} value was too low to permit determination of *K*_m values for NADP and D,L-G3P.

‡ Substrate inhibition was observed for [D,L-G3P] > 150 μM.

deacylation was rate-limiting under steady-state conditions [2]. It was also demonstrated that the rate-determining step within deacylation was associated with hydrolysis, whereas hydride transfer was rate-determining in acylation. Therefore, before interpreting the steady-state kinetic data, we first determined whether the rate-limiting step was still associated with the deacylation step for mutated GAPNs. For that, experiments were carried out at pH 8.2 and 25 °C under the following conditions, i.e. T244S GAPN (4 and 8 μM), NADP (0.03 mM), D,L-G3P (1.5 mM); K178A GAPN (4 and 8 μM), NADP (1 mM), D,L-G3P (0.15 mM); T244V GAPN (4 and 8 μM), NADP (1 mM), D,L-G3P (0.2 mM). No burst of NADPH formation was observed irrespective of the mutated GAPN and the measured rate constants were similar to the rate values determined under steady-state conditions (see next paragraph). These results showed that the rate-limiting step is associated with the acylation step for T244S, T244V and K178A GAPNs in contrast with the wild-type (Table 3). More precisely, as shown below, the rate-limiting step in T244S and K178A GAPNs is associated with hydride transfer. Therefore, to analyse a possible effect of the mutations introduced at positions 178 and 244 in terms of change in the apparent affinity constant for the G3P substrate and in rate constants, only the *k*_{ac} (acylation constant) value and the *K*_m value for G3P of the wild-type in the acylation step have been considered.

T244S GAPN

As shown in Table 3, substituting serine for Thr²⁴⁴ resulted in a 2-fold decrease in *K*_m for NADP with a value of 10 μM. An inhibitory effect was observed for [NADP] > 60 μM. The *K*_m value for D,L-G3P decreased by a factor of 4 and the *k*_{cat} value decreased drastically, by a factor of 2900, relative to the *k*_{ac} value of the wild-type (Tables 3 and 4). At optimum pH 8.2, the *k*_{cat} value was decreased by a factor of 2.1 when D-[1-²H]G3P was used as a substrate (Table 4). This strongly suggested that hydride transfer is rate-limiting. Therefore the hydride rate constant is decreased 2900-fold compared with the wild-type. The pH-rate profile was then studied over a pH range 5–8.75 at a saturating concentration of 1.5 mM D,L-G3P and at a concentration of 30 μM NADP, where

Table 4 Parameters for the pH-dependence of the k_{cat} values for the T244S, T244V and K178A GAPNs

pK_{app} and k_{cat} values were deduced from non-linear regression analysis of experimental data obtained at 25 °C against a single pK_{a} model. The substrate isotope effects were determined as described in the Experimental section.

GAPN	$pK_{\text{app}1}$	$pK_{\text{app}2}$	k_{cat} (s^{-1})	Substrate isotopic effect
Wild-type*	6.2 ± 0.1	7.5 ± 0.1	$790 \pm 20^*$	2.7
T244S	6.8 ± 0.1	–	$0.27 \pm 0.03^\dagger$	2.1
T244V‡	–	–	$\sim 0.002^\dagger$	–
K178A	6.7 ± 0.1	–	$0.020 \pm 0.002^\dagger$	2.1

* The acylation rate constant for the wild-type was extrapolated from the value measured at 10 °C (from [2]).

† From Table 3.

‡ The k_{cat} value was too low to allow accurate determination of pK_{a} and substrate isotopic effect.

NADP does not behave as an inhibitor. As shown in Figure 3, the pH– k_{cat} profile exhibited a sigmoidal curve that can be related to the contribution of one ionizable group of pK_{app} 6.8 that must be deprotonated for acylation, and characterized by a k_{cat} of 0.27 s^{-1} . Compared with wild-type, pK_{app} of 6.8 would correspond to that of catalytic Cys³⁰². The fact that the pH– k_{cat} profile depends on Cys³⁰² pK_{app} and not on Glu²⁶⁸ pK_{app} , which was shown to be 7.6 in the wild-type [9], could be indicative of relative positioning of Cys³⁰² and Glu²⁶⁸ in the T244S ternary Michaelis complex, slightly different from that found in the wild-type ternary complex.

T244V and K178A GAPNs

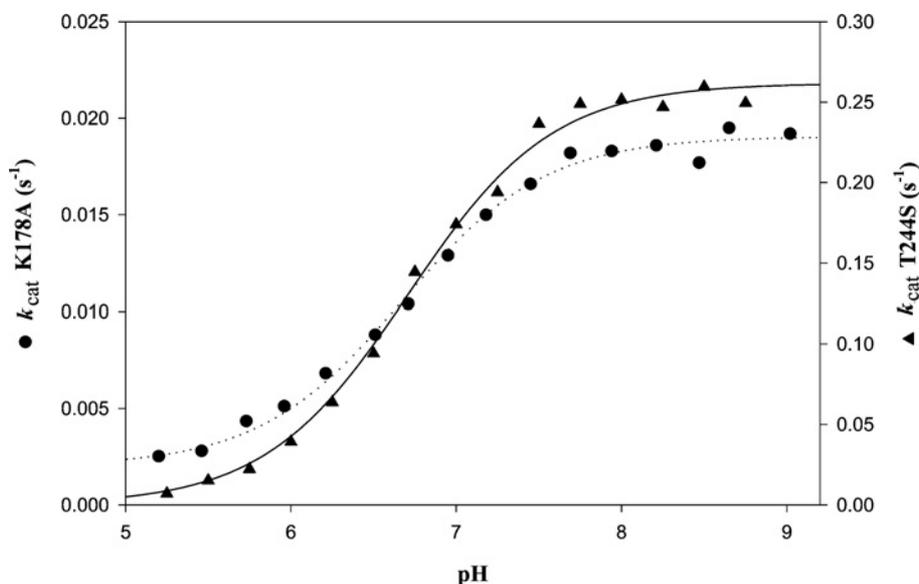
The kinetic parameters are summarized in Table 3. The T244V substitution led to a drastic 250 000-fold decrease of the k_{cat} value. The k_{cat} value of $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ was so low that determination of K_{m} values for NADP and D,L-G3P was not possible. The k_{cat} value for K178A GAPN was strongly reduced by a factor of 25 000

and the K_{m} values for NADP and D,L-G3P were 3-fold higher and 40-fold lower respectively, with respect to the wild-type. The large decrease in the D,L-G3P K_{m} value remains to be explained. Under steady-state conditions at optimum pH 8.2, a substrate kinetic isotopic effect of 2.1 was observed with D-[1-²H]G3P (Table 4). Thus hydride transfer is also rate-limiting and is 25 000-fold less efficient than with the wild-type. The pH–rate profile was also studied over a pH range 5–9. k_{cat} values for K178A were determined at saturating concentrations of 0.15 mM D,L-G3P and 1 mM NADP respectively. As shown in Figure 3, the pH– k_{cat} profile exhibited a sigmoidal curve that can also be related to the contribution of one ionizable group of pK_{app} 6.7 and characterized by a k_{cat} value of 0.02 s^{-1} . Compared with the wild-type, pK_{app} of 6.7 would correspond to that of catalytic Cys³⁰², a value similar to that determined for T244S GAPN.

Structure of the T244S apo-like form

The $(2F_{\text{o}} - F_{\text{c}})$ electron-density map is well defined for all of the structure. Difference maps revealed the presence of NADP in the four monomers. Three sulfate ions coming from the crystallization medium have also been identified in monomer D, whereas only two were present in monomer B, and one in each of monomers A and C. The sulfate anion whose position is conserved in all four monomers occupies the same location as the sulfate anion SO₄a found in the wild-type apo structure (Apo1 and Apo2 [15,12]), while the other is located on the protein surface.

The least-squares superimpositions involving the 474 C α atoms of one subunit of the apo-like wild-type [15] with each subunit of the T244S GAPN structure result in r.m.s.d. values less than 0.29 Å, showing that the overall structures are very close. Local differences are limited to solvent-exposed regions, mobile loops and to the active-site region. In the wild-type structure, Thr²⁴⁴ is located at the end of a β -strand and its β -hydroxy group is hydrogen-bonded to the ϵ -amino group of Lys¹⁷⁸, a residue located in an α -helix. In the T244S structure, the β -hydroxy group of

**Figure 3** pH-dependence of the steady-state rate constant k_{cat} for K178A and T244S GAPNs

pH-dependence of k_{cat} was studied over the pH range 5.25–8.75 for T244S GAPN or 5.25–9.00 for K178A GAPN with a mixed reaction buffer consisting of 120 mM Tricine, 30 mM imidazole and 30 mM ethanoic acid at a constant ionic strength of 0.15 M. The other experimental conditions were as follows: 0.15 mM D,L-G3P, 1 mM NADP and 1.65 μM K178A GAPN; and 1.5 mM D,L-G3P, 0.03 mM NADP and 0.5 μM T244S GAPN. Data for T244S (\blacktriangle) and K178A (\bullet) GAPNs were best fitted by non-linear regression analysis against a single pK_{app} model, identified by the best-fit theoretical curves (solid line and dotted line respectively). S.E.M. on each experimental point was less than 5%.

Ser²⁴⁴ adopts the same conformation and its interaction with Lys¹⁷⁸ is conserved. The quality of the ($2F_o - F_c$) electron-density map is good enough to model the NMN moiety of the NADP molecule (Figure 1B). In particular, the pyridinium ring adopts a conformation, clearly different from that depicted for wild-type GAPN–NADP and ALDH₂–NAD binary complexes which was described to be suitable for an efficient hydride transfer [17]. In the T244S GAPN, the pyridinium ring is stabilized through van der Waals interactions with Cys³⁰², Pro¹⁶⁷ and Leu¹⁷⁴. Cys³⁰² is located after an α -helix, Pro¹⁶⁷ lies at the end of a β -strand, and Leu¹⁷⁴ is located on an α -helix. Moreover, the conformation of the side chain of catalytic Cys³⁰² is closer to that found in the wild-type apo form than in the wild-type–NADP complex and the salt bridge between Arg⁴⁵⁹ and Glu²⁶⁸ remains present, albeit that NADP is bound (Figure 1A).

Finally, although the side chain of Arg³⁰¹ was shown to bind the sulfate anion, called SO₄a, in the wild-type apo structures (Apo1 and Apo2 [12,15]) and was shown to both contribute to G3P binding and be involved in the efficient positioning of G3P relative to Cys³⁰² within the ternary complex GAPN–NADP–G3P [26], it is positioned opposite to the SO₄a anion corresponding to the C-3 phosphate of G3P and interacts with the carbonyl groups of Gly²⁹⁴ and Ala²⁹³. It is probable that the conformation adopted by the side chain of Arg³⁰¹ in the binary complex corresponds instead to an alternative conformation which is not representative of the positioning of its guanidinium group within the competent wild-type ternary complex. Indeed, no significant K_m change for G3P accompanies the drastic decrease of the acylation rate observed for the T244S GAPN in contrast with what was observed for the R301L GAPN [26].

DISCUSSION

A key aspect of the chemical mechanism of the CoA-independent ALDH family is the requirement of a conformational isomerization of the NMN(H) portion of the cofactor after the oxidoreduction process to allow Glu²⁶⁸ to play its role in the deacylation step [18]. The fact that the acylation step in GAPN, and also many other CoA-independent ALDHs, is not rate-limiting and is efficient implies several prerequisites for this step. One of those relates to the optimal positioning of the nicotinamide ring towards the hemithioacetal within the ternary acylating complex. Several X-ray structures of binary ALDH–NAD(P) complexes reveal a great conformational flexibility of the NMN portion of the NAD(P) molecule, in particular of the nicotinamide ring (see, e.g., [11,14–15]). However, once the transient hemithioacetal intermediate is formed, the NMN moiety, in particular in GAPN, must be positioned such that an efficient and stereospecific transfer of hydride ion occurs towards C-4 of the nicotinamide ring. As indicated in the Introduction, invariant Thr²⁴⁴ is postulated to play a major role in the positioning of the nicotinamide ring within the ternary complex of CoA-independent ALDHs. The kinetic and structural data reported here on GAPN strongly favour such an assumption, in particular of the critical role of the β -methyl group of Thr²⁴⁴.

Role of the β -methyl group of Thr²⁴⁴

Substitution of serine for Thr²⁴⁴ led to a change in the nature of the rate-limiting step which becomes associated with the acylation step. Hydride transfer becomes rate-limiting and its efficiency is strongly decreased by a factor of 2900 compared with the wild-type. This drastic effect could be the consequence of changes occurring in the location and orientation of the nicotinamide

ring relative to the hemithioacetal intermediate within the ternary complex, thereby preventing an efficient hydride transfer. The T244S GAPN structure in the presence of NADP clearly shows that the absence of the β -methyl group leads to a unique stabilized position of the nicotinamide ring clearly distinct from that hypothesized for the 'hydride transfer conformation' in CoA-independent ALDHs including GAPN [10,15–17]. The crystal structure presented herein is likely to be representative of the position occupied by the nicotinamide ring within the T244S GAPN–NADP complex in solution. This is in agreement with the fact that: (i) the formation of the binary complex T244S GAPN–NADP is not able to promote the chemical activation of Cys³⁰² (its pK_{app} remains around 9) in contrast with what was observed for the wild-type [9], and (ii) the salt bridge between Arg⁴⁵⁹ and Glu²⁶⁸, which is considered typical of the apo form [12], is still present in the X-ray binary complex structure.

Determination of the structure of a hemithioacetal intermediate is not possible because of its transient nature. If we assume that the nicotinamide conformation in the T244S hemithioacetal intermediate–NADP complex is the one observed in the crystal structure of the binary complex T244S GAPN–NADP, the poor efficiency of the hydride transfer could be explained by non-optimal positioning of the nicotinamide ring relative to the hemithioacetal intermediate. The 0.6-unit increase in pK_{app} of Cys³⁰² compared with the wild-type, which is similar to the contribution of the positively charged nicotinamide ring in lowering the pK_{app} of Cys³⁰² in the wild-type [9], can be also interpreted as the consequence of positioning of the nicotinamide ring relative to Cys³⁰² slightly different from that in the wild-type acylating ternary complex. Therefore the role of the β -methyl group of Thr²⁴⁴ in the wild-type would be to mainly allow the nicotinamide ring to adopt a conformation suitable for an efficient hydride transfer.

An alternative explanation would relate to the positioning of the C-1 hydroxylate of the hemithioacetal intermediate relative to the oxyanion hole rendering it unsuitable for hydride transfer. However, this latter assumption is rather unlikely. First, the apparent affinity constant of T244S GAPN for G3P is not significantly changed. Secondly, whatever the X-ray structures considered, including those of the binary complex T244S GAPN–NADP, the apo-like wild-type and the ternary thioacylenzyme intermediate, the side chain of Asn¹⁶⁹ involved in the oxyanion hole formation is always similarly positioned in all the structures [15,18].

Role of the β -hydroxy group of Thr²⁴⁴

As mentioned in the Introduction, the Thr²⁴⁴ β -hydroxy group, which is hydrogen-bonded to the Lys¹⁷⁸ ϵ -amino group, can help the β -methyl group of Thr²⁴⁴ to position the nicotinamide ring in a conformation suitable for hydride transfer. The T244V substitution was therefore intended to (i) determine the consequence of the loss of the hydrogen bond between the Thr²⁴⁴ β -hydroxy group and the Lys¹⁷⁸ ϵ -amino group, and (ii) to introduce a valine residue invariant at this position in CoA-dependent ALDHs whose acylation step was shown to be as efficient as in GAPN [27]. Removing the β -hydroxy group in fact drastically alters the catalytic properties of the enzyme. The efficiency of the rate-limiting acylation step is decreased 250 000-fold and 86-fold compared with the wild-type and T244S GAPNs respectively. Although it was not possible to determine whether hydride transfer remained rate-determining within the acylation step because of the very low k_{cat} value, the larger decrease of k_{cat} probably originates from the disruption of the hydrogen-bond interaction between the

residues at positions 244 and 178, thus leading to formation of an inefficient T244V ternary complex. However, one cannot exclude the possibility that the very low k_{cat} value of T244V GAPN is also due to additional structural changes induced by the presence of a valine residue in the hydrophilic environment of the GAPN active site.

The substitution of alanine for the counterpart residue Lys¹⁷⁸ also appears to be informative and complementary to the studies carried out on T244S GAPN. In fact, the K178A and T244S GAPNs exhibited very similar catalytic properties. First, the rate-limiting step is associated with hydride transfer and a 25 000-fold decrease of the k_{cat} value was observed. Secondly, the pK_{app} values for Cys³⁰² are equivalent in both ternary complexes, i.e. 6.7 compared with 6.8. Therefore it is tempting to interpret these results in a similar way to that developed in the preceding section for the T244S GAPN. So, the disruption of the Thr²⁴⁴–Lys¹⁷⁸ hydrogen-bond interaction by substituting either valine for Thr²⁴⁴ or alanine for Lys¹⁷⁸ would alter the positioning of Thr²⁴⁴, in particular of its β -methyl group and thus of the nicotinamide ring that could explain the very poor efficiency of the hydride transfer.

Relevance to the two-step catalytic mechanism

The major feature that has emerged from the present study lies in the critical contribution of the β -methyl group of invariant Thr²⁴⁴ in the efficiency of the GAPN acylation step. It probably contributes to formation of a transient hemithioacetal intermediate with an adequate positioning of the nicotinamide ring to allow an efficient hydride transfer. Such a role is expected to be general for all the members of the CoA-independent ALDH family. This is supported further by the presence of an invariant valine residue at position 244 in the CoA-dependent ALDH family. In these ALDHs, position 178 is mostly occupied by a methionine residue. Thus it is tempting to propose that one of the two methyl groups of the β -branched side chain of Val²⁴⁴ is positioned like that of β -methyl of Thr²⁴⁴ and therefore fulfils a similar function thanks to the other methyl group of Val²⁴⁴ which could interact via hydrophobic interactions with the side chain of residue 178. Such a hypothesis remains to be validated. In addition to Thr²⁴⁴, the side chain of invariant Glu³⁹⁹ was shown to play an essential role by anchoring the NMN ribose through hydrogen bonds with the hydroxy groups of the ribose [28]. Lastly, it was also hypothesized that the negative charge of the tetrahedral oxyanion intermediate participates in the efficient positioning of the positively charged nicotinamide ring within the ternary complex hemithioacetal intermediate–NAD(P) [18]. Taken together, this probably delineates a pattern of interactions that stabilizes an efficient ‘hydride transfer conformation’ of the NMN moiety of the cofactor, once the transient hemithioacetal intermediate is formed.

Finally, recent structural data on the thioacyl intermediate of GAPN suggested that a low energetic barrier exists between the conformations adopted by the NMN(H) moiety during the two-step catalytic cycle of the CoA-independent ALDHs [18]. Based on the structure of the crystalline binary complex T244S GAPN–NADP, we propose that the β -methyl group of Thr²⁴⁴ might also play a role in the efficiency of the conformational isomerization of the NMNH after hydride transfer.

We are grateful to S. Boutserin for her very efficient technical help. We also thank Dr Van Dorsselaar and Dr G. Chevreux for mass determination and Dr S. Sonkaria for careful reading of the manuscript. A. P. was fellow of the French Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies (MRNT). This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the University Henri Poincaré Nancy I, the IFR 111 Bioingénierie and local funds from the Région Lorraine.

REFERENCES

- Wang, X. and Weiner, H. (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 237–243
- Marchal, S., Rahuel-Clermont, S. and Branlant, G. (2000) Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* **39**, 3327–3335
- Vallari, R. C. and Pietruszko, R. (1981) Kinetic mechanism of the human cytoplasmic aldehyde dehydrogenase E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 9–19
- Shone, C. C. and Fromm, H. J. (1981) Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20**, 7494–7501
- Söhling, B. and Gottschalk, G. (1993) Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* **212**, 121–127
- Farres, J., Wang, T. T., Cunningham, S. J. and Weiner, H. (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 2592–2598
- Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. and Meighen, E. (1995) Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP⁺-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **34**, 16725–16732
- Vedadi, M. and Meighen, E. (1997) Critical glutamic acid residues affecting the mechanism and nucleotide specificity of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **246**, 698–704
- Marchal, S. and Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* **38**, 12950–12958
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. and Hurley, D. T. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701–711
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. and Eklund, H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 2106–2117
- Cobessi, D., Tête Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. and Aubry, A. (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **300**, 141–152
- Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tête-Favier, F., Aubry, A. and Branlant, G. (2001) Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 15–28
- Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. and Wang, B. C. (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317–326
- Cobessi, D., Tête Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A. (1999) Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **290**, 161–173
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. and Baker, E. N. (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**, 1541–1551
- Perez-Miller, S. J. and Hurley, T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100–7109
- D'Ambrosio, K., Pailot, A., Talfournier, F., Didierjean, C., Benedetti, E., Aubry, A., Branlant, G. and Corbier, C. (2006) The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis. *Biochemistry* **45**, 2978–2986
- Corbier, C., Mougin, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A. and Branlant, G. (1990) The nicotinamide subsite of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by site-directed mutagenesis. *Biochimie* **72**, 545–554
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326
- 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. et al. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921
- Reference deleted
- Laskowsky, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291
- Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51–55

- 25 Esnouf, R. M. (1999) Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 938–940
- 26 Marchal, S. and Branlant, G. (2002) Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **277**, 39235–39242
- 27 Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F. and Branlant, G. (2006) Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **395**, 107–115
- 28 Ni, L., Sheikh, S. and Weiner, H. (1997) Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 18823–18826
-

Received 6 June 2006/21 August 2006; accepted 8 September 2006

Published as BJ Immediate Publication 8 September 2006, doi:10.1042/BJ20060843

1.3. Résultats non mentionnés dans la publication

Les mutants K178A et T244V sont caractérisés par un comportement différent au cours de la purification. En effet, ils précipitent en présence d'une concentration en sulfate d'ammonium de 30% alors que l'enzyme de type sauvage et le mutant T244S restent solubles jusqu'à des concentrations supérieures à 40%. De plus, le profil d'éluion obtenu lors de l'étape de chromatographie hydrophobe indique un caractère hydrophobe de surface plus marqué pour les mutants T244V et K178A. Deux approches complémentaires ont donc été utilisées afin d'étudier l'impact de la rupture de la liaison hydrogène K178/T244 en termes de perturbations structurales locales ou plus globales.

La première approche a consisté à utiliser la technique de dichroïsme circulaire pour essayer de caractériser d'éventuels changements d'états conformationnels. En préalable, et à titre de contrôles, des spectres ont été réalisés dans l'UV lointain dans le but de vérifier que ces substitutions ne conduisaient pas une modification du contenu global en structures secondaires. Comme attendu, les spectres obtenus pour le type sauvage et les mutants K178A et T244S sont très proches (Figure 14). La petite différence observée pour le mutant T244S peut s'expliquer par une légère sur estimation de la concentration utilisée. Les différences observées au niveau de la zone 200-220 nm reflètent des modifications fines de la structure globale de la protéine pour le mutant K178A. Cependant, les expériences réalisées ne permettent pas d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats.

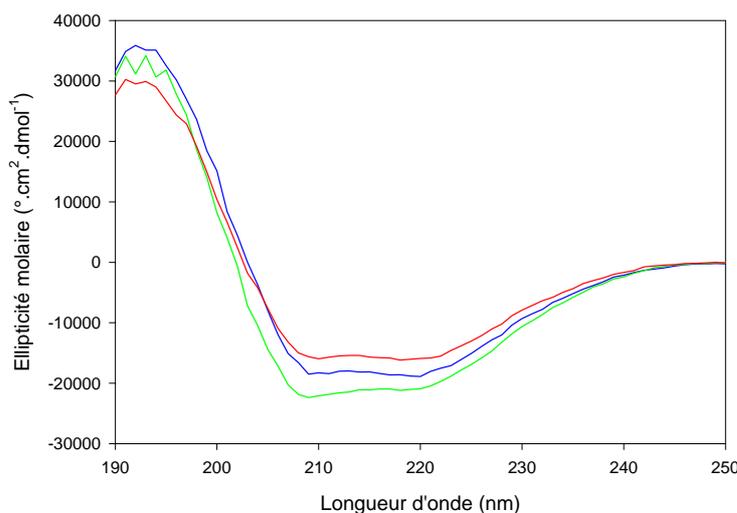


Figure 14 : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (190-250 nm) obtenus pour le type sauvage (en bleu) et les mutant T244S (en rouge) et K178A (en vert) de la GAPN de *S. mutans*. Les mesures sont réalisées en tampon KPi 10 mM, pH 8,2 à la température de 25°C. La concentration en enzyme est de 0,1 mg/ml. La longueur d'onde augmente par incrément de 1 nm.

Les signaux obtenus dans l'UV proche (250-300 nm) fournissent des informations sur l'environnement des résidus aromatiques et représentent une véritable "carte d'identité" de la protéine. Les résultats obtenus montrent que les trois spectres ne sont pas superposables. En particulier, le spectre du mutant T244S diffère nettement de celui obtenu pour le type sauvage (Figure 15). Ce résultat peut s'expliquer par la contribution du NADP au signal car le spectre de ce mutant a été obtenu à partir d'une forme partiellement *apo* (la forme *apo* étant impossible à obtenir). A l'inverse, le spectre du mutant K178A est relativement proche de celui obtenu pour le type sauvage. Les signaux sont identiques pour des longueurs d'onde supérieures à 290 nm, ce qui montre que l'environnement des résidus tryptophane n'est pas modifié par rapport au type sauvage. Par contre, la différence observée pour la région 250-290 nm semble significative et reflète sans doute une légère modification de l'environnement des résidus tyrosine. Malheureusement, les limitations de cette approche spectroscopique ne nous permettent pas d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats.

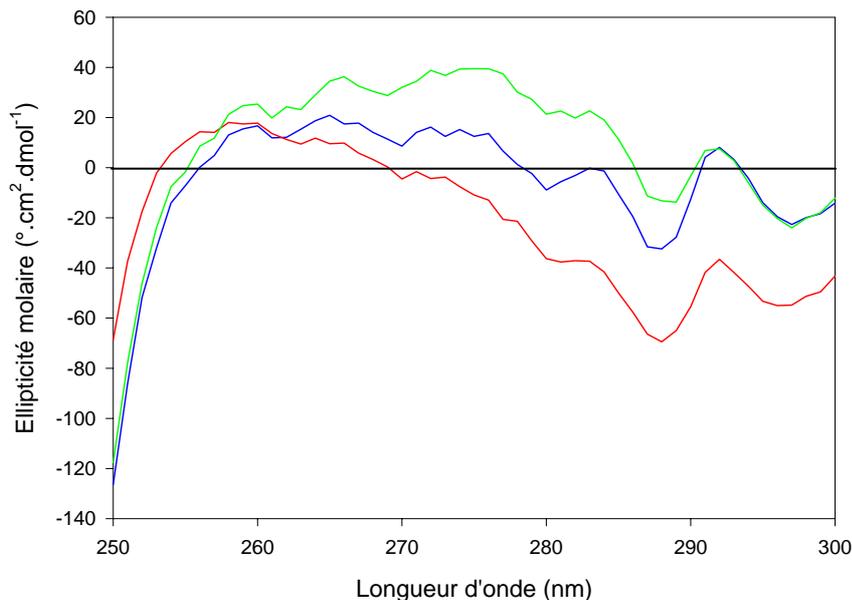


Figure 15 : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche (250-300 nm) obtenus pour le type sauvage (en bleu) et les mutants T244S (en rouge) et K178A (en vert) de la GAPN de *S. mutans*. Les mesures sont réalisées en tampon KPi 10 mM, pH 8,2 à la température de 25°C. La concentration en enzyme est de 0,8 mg/ml. La longueur d'onde augmente par incrément de 1 nm.

Une seconde approche a consisté à utiliser la microcalorimétrie de balayage (DSC) pour évaluer la stabilité thermique de chacune de ces trois protéines. Dans le cas de l'enzyme sauvage, les résultats obtenus sont conformes à ceux précédemment publiés par notre équipe (Rahuel-Clermont *et al.*, 2005). Le thermogramme présente deux endothermes de température

de demi-dénaturation (T_M) de respectivement 45°C et 72°C pour les endothermes appelés B et A, correspondant à deux conformères du tétramère de GAPN en équilibre thermodynamique lent. La forme B représente le complexe binaire GAPN/phosphate avec quatre molécules de phosphate fixées par tétramère alors que la forme A correspond à la forme *apo*. Nos résultats montrent que les deux mutants testés présentent des thermogrammes différents de celui obtenu avec l'enzyme sauvage. En effet, la trace obtenue pour le mutant K178A ne comporte qu'un endotherme caractérisé par un T_M de 72°C qui correspond à la forme A de l'enzyme sauvage (Figure 16). Dans le cas du mutant T244S, l'endotherme A est présent mais un épaulement est également observé dans la gamme de température où est retrouvé l'endotherme B pour l'enzyme de type sauvage. Ce résultat peut être expliqué, au moins partiellement, par la présence de NADP (0,8 moles par tétramère) dans ce mutant, car il a été montré que la liaison du NADP à GAPN conduit également à la formation d'une espèce thermolabile de T_M équivalente à la forme B et correspondant à une forme "*apo-like*" (Rahuel-Clermont, résultats non publiés). De plus, ceci est en accord avec les résultats obtenus par une approche cinétique à savoir l'utilisation de la sonde chimique 2-PDS (voir publication).

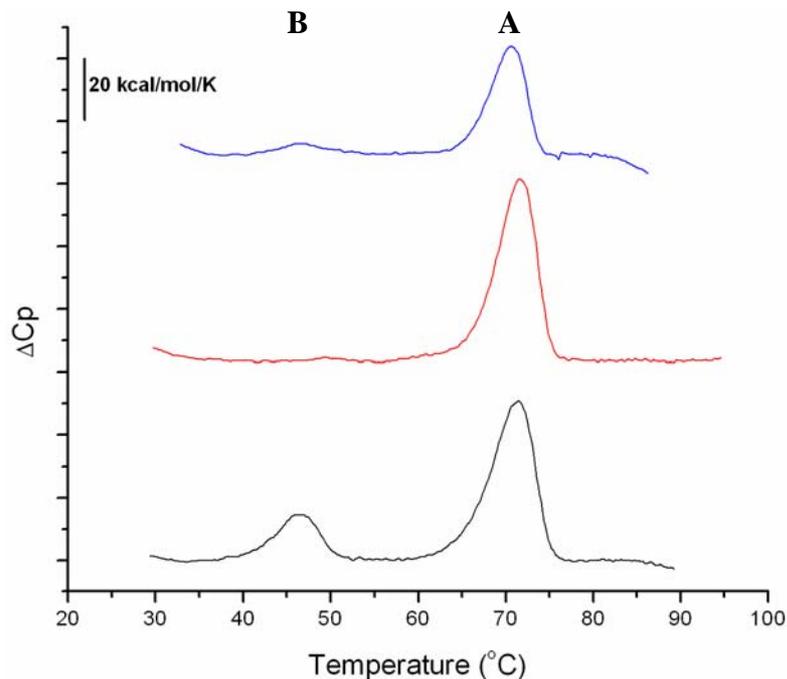


Figure 16 : Thermogrammes obtenus par DSC pour la forme *apo* de l'enzyme sauvage (endotherme noir) et du mutant K178A (endotherme rouge), et de la forme partiellement *apo* du mutant T244S (endotherme bleu) de la GAPN de *S. mutans*. Les mesures sont réalisées en tampon KPi 50 mM, pH 8,2 à une température variant de 30 à 90°C. La concentration en enzyme est de 1 mg/ml. La vitesse de défilement est de 1°C par minute. Dans un souci de clarté, les endothermes sont mis les uns au dessus des autres et non superposés. C'est pourquoi les valeurs représentées sur l'axe des ordonnées (ΔC_p) ne sont pas représentatives de la réalité.

Une interprétation du résultat obtenu pour le mutant K178A serait de considérer que l'absence de l'endotherme B est la conséquence d'une diminution de l'affinité de la forme A pour l'ion phosphate. Comme il a été établi que le site de liaison du phosphate correspond au site du groupement phosphate situé en C-3 du substrat G3P (Rahuel-Clermont *et al.*, 2005), cela pourrait se traduire par une diminution de l'affinité apparente du mutant pour le G3P. Le fait que la valeur de K_M pour le G3P mentionnée dans le tableau 3 de la publication soit au contraire plus faible que celle déterminée pour le type sauvage n'est pas en faveur d'une telle hypothèse. Il avait été proposé pour le type sauvage de GAPN que les effets de déstabilisation thermique, consécutifs à la liaison de phosphate, pourraient être associés à des réorganisations conformationnelles dans le site actif. Une alternative serait donc de considérer que le site actif du mutant K178A ne présente pas la même flexibilité conformationnelle que celui du type sauvage. Par conséquent, il est possible que 1) la liaison de phosphate dans le site actif du mutant K178A ne conduise plus à la formation d'une espèce thermolabile ou, 2) les vitesses de transition entre les formes A et B soient encore plus faibles que celles déterminées pour le type sauvage (de l'ordre de 0,3-0,4 h⁻¹).

Les résultats obtenus par les deux approches expérimentales ne nous permettent pas de tirer de conclusions définitives. Par contre, elles indiquent que la substitution K178A conduit à des perturbations structurales sans doute "subtiles" au niveau du site actif qui peuvent également contribuer à la formation d'un complexe ternaire non efficace.

2. Caractérisation de la conformation adoptée par le NADP(H) après le transfert d'hydrure

Les études structurales réalisées jusqu'à présent n'avaient pas permis de caractériser la conformation adoptée par le NADP(H) après le transfert d'hydrure. En collaboration avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy dirigée par le Dr Aubry, la première structure d'un intermédiaire covalent thioacylenzyme pour l'ensemble de la famille des ALDH a pu être obtenue. L'accumulation de cet intermédiaire a été rendue possible par l'utilisation du mutant E268A qui présente la même efficacité que le type sauvage au niveau de l'étape d'acylation mais une étape d'hydrolyse très fortement ralentie. La formation du complexe covalent a donc été obtenue par diffusion du substrat G3P dans un complexe binaire cristallin E268A GAPN/NADP puis arrêt de la réaction par congélation brutale. L'analyse des cartes de densité

électronique indique que la C302 catalytique adopte deux conformations dans chaque monomère, chacune avec un taux d'occupation de 0,5. Une conformation a pu être assignée à la C302 liée au substrat qui présente les caractéristiques géométriques attendues pour un intermédiaire thioacylenzyme et une seconde conformation à la C302 libre. Un contrôle indispensable consistait à caractériser l'état redox du cofacteur dans le complexe ternaire covalent. Pour ce faire, la quantification simultanée des formes oxydée et réduite du cofacteur présentes dans les cristaux a été entreprise par HPLC. L'obtention d'un rapport molaire NADPH/NADP de 24 montrait que l'étape d'acylation avait eu lieu dans les cristaux. D'autre part, étant donné la spécificité de substrat très stricte de GAPN, la formation de NADPH ne pouvait pas être due à la réduction d'autres aldéhydes éventuellement présents dans le milieu de cristallisation.

Deux conformations appelées conf A et conf B ont également pu être identifiées pour la portion NMNH du cofacteur. Elles sont retrouvées dans chaque monomère et présentent un taux d'occupation de 0,5. Cependant, le résultat majeur est la mise en évidence d'un basculement important de la portion NMNH du cofacteur après l'étape d'acylation au niveau d'une cavité, formée de résidus conservés, et également retrouvée dans les autres structures connues d'ALDH non CoA-dépendantes. Cette conformation est maintenant compatible avec une étape d'hydrolyse efficace. Notre travail a donc permis de caractériser pour la première fois la conformation adoptée par le cofacteur après l'étape d'acylation. De plus, il est possible d'étendre nos conclusions à l'ensemble des ALDH non CoA-dépendantes en ce qui concerne la conformation adoptée par le cofacteur après le transfert d'hydrure et le rôle de cette cavité qui constitue vraisemblablement la porte de sortie pour le cofacteur réduit. Enfin, ceci est en accord avec le mécanisme cinétique des ALDH non CoA-dépendantes à savoir un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel le cofacteur réduit est relargué en dernier.

Publication 2 : "The First Crystal Structure of a Thioacylenzyme Intermediate in the ALDH Family: New Coenzyme Conformation and Relevance to Catalysis".

The First Crystal Structure of a Thioacylenzyme Intermediate in the ALDH Family: New Coenzyme Conformation and Relevance to Catalysis[†]

Katia D'Ambrosio,^{‡,§} Arnaud Pailot,^{||} François Talfournier,^{||} Claude Didierjean,[‡] Ettore Benedetti,[§] André Aubry,[‡] Guy Branlant,^{*,||} and Catherine Corbier^{*,‡}

LCM3B, Groupe Biocristallographie, UMR 7036, CNRS-UHP, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France, Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, Dipartimento delle Scienze Biologica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", 80134 Napoli, Italia, and MAEM, UMR 7567, CNRS-UHP, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France

Received July 29, 2005; Revised Manuscript Received January 3, 2006

ABSTRACT: Crystal structures of several members of the nonphosphorylating CoA-independent aldehyde dehydrogenase (ALDH) family have shown that the peculiar binding mode of the cofactor to the Rossmann fold results in a conformational flexibility for the nicotinamide moiety of the cofactor. This has been hypothesized to constitute an essential feature of the catalytic mechanism because the conformation of the cofactor required for the acylation step is not appropriate for the deacylation step. In the present study, the structure of a reaction intermediate of the E268A-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPN) from *Streptococcus mutans*, obtained by soaking the crystals of the enzyme/NADP complex with the natural substrate, is reported. The substrate is bound covalently in the four monomers and presents the geometric characteristics expected for a thioacylenzyme intermediate. Control experiments assessed that reduction of the coenzyme has occurred within the crystal. The structure reveals that reduction of the cofactor upon acylation leads to an extensive motion of the nicotinamide moiety with a flip of the reduced pyridinium ring away from the active site without significant changes of the protein structure. This event positions the reduced nicotinamide moiety in a pocket that likely constitutes the exit door for NADPH. Arguments are provided that the structure reported here constitutes a reasonable picture of the first thioacylenzyme intermediate characterized thus far in the ALDH family and that the position of the reduced nicotinamide moiety observed in GAPN is the one suitable for the deacylation step within all of the nonphosphorylating CoA-independent ALDH family.

Two phylogenetically and structurally unrelated families of NAD(P)-dependent aldehyde dehydrogenases (ALDH)¹ catalyze the oxidation of aldehydes into activated or non-activated acids. These enzymes are known to be involved in many biological functions such as cellular differentiation, central metabolism, or detoxification pathways. They share a similar chemical mechanism involving two major steps: first, an acylation step common to both families and, second, a deacylation step that differs by the nature of the acyl-

acceptor. The acylation step includes the formation of a thiohemiacetal intermediate via a nucleophilic attack of the catalytic cysteine on the aldehydic function followed by an oxidoreduction process leading to the formation of a thioacylenzyme intermediate and NAD(P)H. In the phosphorylating ALDH family, inorganic phosphate acts as an acyl-acceptor, thus leading to the formation of phosphor-esters, whereas in the nonphosphorylating ALDH family, the thioacylenzyme intermediate undergoes a nucleophilic attack by either a water molecule or a coenzyme A (CoA) molecule, thus leading to either nonactivated or CoA-activated acids, respectively. Moreover, previous studies have highlighted major differences in the kinetic mechanism of ALDHs depending upon the nature of the deacylation step following the oxido-reduction process. In the phosphorylating and nonphosphorylating CoA-dependent ALDHs, kinetic data support a ping-pong mechanism in which the release of the reduced cofactor occurs prior to the deacylation step, i.e., phosphorylation or transthioesterification (1–3). The picture is clearly different for the nonphosphorylating CoA-independent ALDHs, which exhibit an ordered sequential mechanism in which NAD(P)H dissociates last (4, 5). The fact that the cofactor remains bound to the enzyme along the two-step catalytic mechanism imposes the reduced nicotinamide mononucleotide (NMNH) moiety to move away from the initial position of the nicotinamide mononucleotide

[†] This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the University Henri Poincaré Nancy I, the IFR 111 Bioingénierie, and local funds from the Région Lorraine.

* To whom correspondence should be addressed: MAEM, UMR 7567, CNRS-UHP, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France. Telephone: +33 3 83 68 43 04. Fax: +33 3 83 68 43 07. E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr (G.B.); LCM3B, Groupe Biocristallographie, UMR 7036, CNRS-UHP, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre Cedex, France. Telephone: +33 3 83 68 47 89. Fax: +33 3 83 40 64 92. E-mail: catherine.corbier@lcm3b.uhp-nancy.fr (C.C.).

[‡] LCM3B.

[§] Università degli Studi di Napoli "Federico II".

^{||} MAEM.

¹ Abbreviations: GAPN, nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; CoA, coenzyme A; NMN(H), nicotinamide mononucleotide oxidized form (reduced form); D-G3P, D-glyceraldehyde-3-phosphate; PEG, poly(ethylene glycol).

(NMN) moiety for permitting the deacylation to occur (see the next paragraph).

Mechanistic aspects were studied extensively, and several invariant residues were shown to be critical for the chemical mechanism of nonphosphorylating CoA-independent ALDHs (6–9). More recently, evidence was put forward for the chemical activation of the catalytic C302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) from *Streptococcus mutans* (10). Moreover, additional studies on GAPN have highlighted the essential roles of (i) an oxyanion hole composed of at least the side chain of the invariant N169 residue that allows an efficient hydride transfer without base catalyst assistance (11, 12) and (ii) the E268 residue in the rate-limiting hydrolysis step through activation and orientation of the attacking water molecule (4). From these results, a scenario for the chemical catalysis of GAPN was proposed (4). Additionally, numerous crystal structures of CoA-independent ALDHs have already been solved in the presence of NAD(P). One of the most striking features of these structures is the conformational flexibility of the NMN moiety of the cofactor (e.g., see refs 13–15). Specifically, two distinct conformations were described for class 1 and class 2 ALDHs. In one conformation, the NMN moiety occupies a position suitable for hydride transfer, while it blocks the way and prevents the catalytic E268 from playing its role in the deacylation step. In contrast, the second conformation in which the NMN moiety moves away from the active site would be suitable for deacylation (16, 17). This observation suggested that movement of the NMNH is a prerequisite for the deacylation. In a recent study, the crystal structures of wild-type and C302S human mitochondrial ALDHs, in binary complexes with NAD⁺ and NADH, have led the authors to assign a preferential conformation of the cofactor related to its redox state; i.e., NAD⁺ would adopt a conformation suitable for hydride transfer, whereas NADH would prefer a contracted conformation suitable for the deacylation process (18). However, recent structural data on GAPN from *Thermoproteus tenax* in complex with its cosubstrate NAD⁺ or its inhibitor NADPH showed that both cofactors adopt a hydride-transfer conformation (19). This result suggested that the redox state of the cofactor is not necessarily the key factor triggering this isomerization step.

In the present study, an approach is described that provides for the first time structural evidence for a conformational isomerization of the cofactor during the catalytic cycle of a nonphosphorylating CoA-independent ALDH. For this purpose, we took advantage of the well-characterized kinetic properties of the E268A–GAPN from *S. mutans*, which showed that substituting Ala for Glu did not significantly affect the acylation rate but drastically reduced the deacylation rate by 3 orders of magnitude (4). Diffusion of the substrate in the crystalline binary complex GAPN–NADP⁺ allowed the accumulation and trapping of the thioacyl-enzyme intermediate within the crystal. The structure reveals an extensive motion of the NMNH moiety of the cofactor after the acylation step and clearly establishes that cofactor isomerization is a prerequisite for the two-step mechanism to occur in nonphosphorylating CoA-independent ALDHs. The data are discussed in relation to previous structural and kinetic studies on GAPN and from an evolutionary viewpoint.

Table 1: Data Collection and Refinement Statistics^a

data collection	
space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i> (Å)	142.5
<i>b</i> (Å)	154.9
<i>c</i> (Å)	112.5
<i>Z</i>	4
resolution (Å)	2.55
outermost resolution shell (Å)	2.61–2.55
temperature (K)	100
total reflections	452 200
unique reflections	79 121
completeness (%)	97.4 (87.9)
<i>R</i> sym (%)	7.4 (24.2)
mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	16.9 (3.2)
refinement	
<i>R</i> factor (%)	19.8 (26.5)
<i>R</i> free (%)	24.8 (32.2)
rmsd from ideal geometry	
bond lengths (Å)	0.006
bond angles (deg)	1.33
average <i>B</i> factor (Å ²)	
all atoms	34.4
protein atoms (14 392)	34.0
water molecules (776)	34.7
NADPH (adenosine 2' 5' P moiety)	48.01
NADPH (NMNH moiety)	53.76
G3P	38.7

^a Values in parentheses in column 2 refer to the outermost resolution shell.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The E268A–GAPN enzyme was produced and purified as already described (11). Its concentration was determined spectrophotometrically as the apo form by using a molar extinction coefficient of $2.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. D-Glyceraldehyde-3-phosphate (D-G3P; Sigma, St. Louis, MO) was prepared from the D-G3P diethylacetal according to the manufacturer, and its concentration was assessed enzymatically using the wild-type GAPN.

Crystallization, Data Collection, and Processing. Crystals of the E268A–GAPN with NADP⁺ were obtained using the hanging drop vapor diffusion method at 293 K. A total of 1 μL of a 70 mg/mL protein solution in 50 mM imidazole buffer at pH 6.8 containing 16 mM of NADP⁺ was mixed with 2 μL of reservoir solution composed of 0.8 M sodium formate, 7% (w/v) poly(ethylene glycol) (PEG) 8000, 10% (w/v) PEG 1000, and 0.1 M imidazole (pH 6.8). The crystals grew within a few days. The thioacyl-enzyme intermediate was obtained by soaking the crystals in a solution containing 0.5 mM D-G3P for 20 min. A 2.55 Å resolution data set was collected at 100 K on beam line BM30A at ESRF, Grenoble, France (FIP, 20). The crystals belong to the space group P2₁2₁2, with unit cell dimensions *a* = 142.5 Å, *b* = 154.9 Å, and *c* = 112.5 Å. Diffracted data were processed using the HKL crystallographic data reduction package (21). Statistics of the data set are summarized in Table 1.

Phasing and Refinement. The structure of the thioacyl-enzyme intermediate was solved by molecular replacement using the wild-type holoenzyme structure as a starting model (PDB code 2euh) (15). Refinement and manual rebuilding were carried out with CNS (22) and TURBO–FRODO (23), respectively. Fourier maps calculated with ($3F_o - 2F_c$) and ($F_o - F_c$) coefficients showed prominent electron-density features in the active-site region. The four monomers of the asymmetric unit were refined without imposing noncrystal-

lographic symmetry restraints. After initial refinement, limited to the enzyme, a model for D-glyceraldehyde moiety acylating C302 was built and introduced into the atomic coordinates set for further refinement. After several cycles of positional and *B*-factor crystallographic refinement, the analysis of the electron-density maps suggested the presence of a double conformation for both the catalytic C302 and the cofactor molecule into each subunit, which were each best-refined with an occupancy factor of 0.5 (see the Results). The ordered water molecules were added automatically and checked individually. Each peak contoured at 3σ in the ($F_o - F_c$) maps was identified as a water molecule, provided that hydrogen bonds would be allowed between this site and the model. The final crystallographic *R*-factor and *R*-free values calculated for the 79 121 independent reflections (in the 20.00–2.55 Å resolution range) were 0.198 and 0.248, respectively. The stereochemical quality of the model was assessed by PROCHECK (24). The most favored and additionally allowed regions of the Ramachandran plot contained 99.6% of the nonglycine residues. The statistics for refinement and model geometry are summarized in Table 1. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank at the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (accession code 2ESD). Figures 1A, 2, and 3 were drawn using BOBSCRIPT (25), and Figures 1B, 4, and 5 were drawn with MOLMOL (26).

Redox State of the Cofactor within the Crystals. Characterization of the redox state of the cofactor within the crystal was carried out by quantification of the NADPH/NADP⁺ ratio by high-pressure liquid chromatography. Crystals were washed to remove any excess of D-G3P and NADP⁺ and then dissolved in acetonitrile (20%), and finally, the GAPN protein was eliminated by centrifugation at 4000g for 10 min at 4 °C. The supernatant was injected onto a Source 15Q anionic column using an ÄKTA Explorer system (Amersham Pharmacia Biotech) previously equilibrated with H₂O. NADP⁺ and NADPH were eluted at 160 and 270 mM, respectively, with a linear gradient of 0–1 M KCl in H₂O at 1 mL/min.

RESULTS

Strategy Used To Obtain the Thioacylenzyme Intermediate. Albeit crystals of the wild-type enzyme have previously been obtained in the presence of ammonium sulfate as a precipitating agent, these conditions were not suitable in the present study because ammonium sulfate might compete with the phosphate of G3P and also because the pH value (ca 5) was too low. Indeed, the active-site C302 (pK_a value 6.1) has to be under the thiolate form to allow an efficient acylation step. New crystallization conditions have therefore been set up, using the approach proposed by Brzozowski et al. (27). The pH of the crystallization medium has been chosen and fixed at a value of 6.8 higher than the pK_a value of C302 and in a range where the deacylation rate is slow enough (4) to allow the accumulation of the thioacylenzyme intermediate within the crystal. Orthorhombic crystals have been obtained using a mixture of PEG 8000 (7%) and 1000 (10%) in 100 mM imidazole buffer as a precipitant; they belong to space group $P2_12_12$ and contain one tetramer per asymmetric unit. These crystals are isomorphous to those of the wild-type holoenzyme obtained in a different crystallization condition (15) and diffract at the same moderate resolution (2.55 Å).

Overall Structure of the Ternary Complex and Comparison with the Wild-Type Holoform. As found for the wild-type holo form (15), the E268A–GAPN from *S. mutans* in the ternary complex exists as a tetramer with four identical subunits related by a noncrystallographic 222 symmetry. Each monomer can be divided into three domains: a cofactor binding domain, composed of a core that resembles the Rossmann fold (28) (residues 145–252) flanked by five α helices and four β strands (residues 2–118 and 450–464), a catalytic α/β domain (residues 253–449), and a small β -stranded protruding domain, which enables oligomerization (residues 119–144 and 465–475).

No significant structural differences are observed between the four monomers of the E268A–GAPN structure, as illustrated by the low global root-mean-square deviation (rmsd) value (0.15–0.26 Å) calculated for the superimposition of the 474 C α atoms. The main differences are located in the N- and C-terminal regions and in regions involved in the interaction between symmetry-related molecules. In particular, higher displacements are found for residues N339–E351, corresponding to the loop connecting α_{11} helix to the β_Q strand (for nomenclature of the secondary structures, see ref 15). This region is located at the protein surface and is involved in crystal packing in monomers A and C. Because the structures of both wild-type and E268A–GAPNs reveal a quasi-perfect 222 symmetry, the least-squares superimpositions involving the 474 C α atoms of the subunit A of the wild-type holoenzyme (15) (PDB code 2euh) were realized with each subunit of the E268A–GAPN. The resulting rmsd values are less than 0.41 Å, showing that the overall structure of the E268A–GAPN is very close to that of the wild-type holoenzyme. Local differences, with values higher than 3 times the rmsd value, are only observed for solvent-exposed residues or regions involved in the crystal packing.

Active Site. In each monomer, the first calculated difference electron-density map already exhibited a strong positive density peak in line with the catalytic C302 sulfur atom, the shape of which was consistent with the presence of a substrate molecule. Nevertheless, it appeared clearly during the refinement steps that the catalytic C302 adopts a double conformation that can be observed in each of the four monomers. The first conformation is superimposable to that found in the wild-type enzyme/NADP binary complex (15), and in this conformation, C302 forms a covalent linkage with the substrate. The second one is that found in the apo form (15), and in this one, no substrate is present (Figure 1A). These two conformations were satisfactorily refined with an occupancy factor of 0.5. The substrate adopts the same position in all of the four monomers and is well-defined in the ($3F_o - 2F_c$) electron-density map (Figure 1A). The continuous electron density from the C302–SG atom to the C1 atom of the substrate highly suggests the presence of a covalent bond, and the flat density shape at C1 satisfies a sp^2 hybridization. Both observations are those expected for a thioacylenzyme intermediate. Furthermore, analysis of the redox state of the cofactor confirmed that acylation has indeed occurred within the crystals (see below). The oxygen atom of the carbonyl group at C1 is hydrogen-bonded to the C302 amide nitrogen (2.75 Å) and to the N169–ND₂ atom (2.75 Å), two groups formerly postulated to be involved in the formation of the oxyanion hole. The oxygen atom at C2

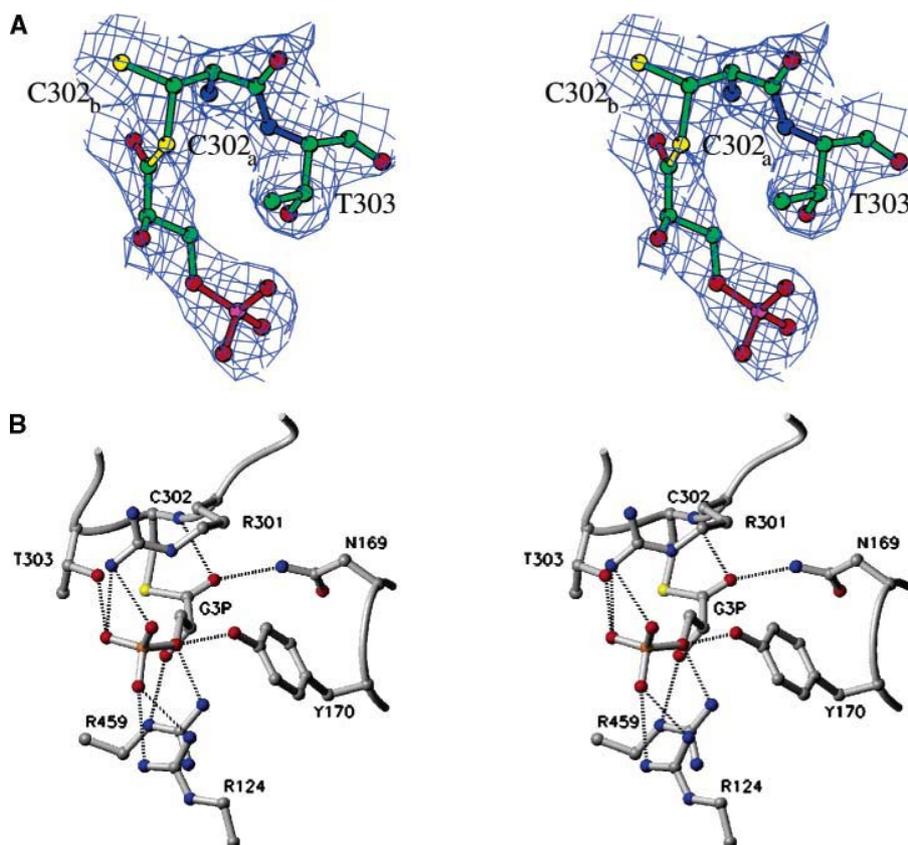


FIGURE 1: Stereoview of the active site. (A) View of the D-G3P molecule in the E268A/NADP/G3P complex (monomer C) in the ($3F_o - 2F_c$) electron-density map (contour level, 1.0σ). The two conformations of the catalytic cysteine (in yellow) are represented: C302a (cysteine side chain bonded to the substrate) and C302b (free cysteine side-chain conformation). (B) View of the active site showing the interactions shared between D-G3P and the protein residues.

Table 2: Interactions between the Substrate, D-G3P, and the Active-Site Residues^a

substrate atoms	thioacylenzyme (E268A-GapN)	C302S-GapN/cofactor/substrate noncovalent ternary complex
O1	N169-ND ₂ (2.77 Å) C302-NH (2.75 Å)	N169-ND ₂ (3.46 Å) S302-NH (3.78 Å)
O2	R459-NE (2.65 Å)	R459-NE (3.74 Å)
O1P	Y170-OH (3.17 Å) —	Y170-OH (3.33 Å) T303-OG1 (2.94 Å)
O2P	R459-NH ^b (3.59 Å)	—
O3P	R301-NH ^b (2.56 Å)	—
O4P	T303-OG1 (2.39 Å) R301-NH ^b (3.10 Å) R124-NH ^b (2.86 Å)	T303-OG1 (3.36 Å) R301-NH ^b (2.86 Å)
	R124-NH ^c (3.16 Å) —	R124-NH ^c (3.95 Å) R459-NH ^b (3.25 Å)

^a Values in italics do not refer to an interaction but are indicated for comparative purposes. ^b This study. ^c From ref 11.

is hydrogen-bonded to the R459-NE (2.65 Å) atom. The phosphate group at C3 is well-oriented to develop interactions with the guanidinium group of three arginine residues found in the neighborhood of the active site (R124, R301, and R459), together with the side chains of Y170 and T303 (Figure 1B). Altogether, the residues that share interactions with the substrate are the same as those depicted to be involved in its binding in the noncovalent C302S/NADP⁺/G3P complex (11). Nonetheless, the interaction pattern and atom distances are different (Table 2). Moreover, the interactions observed here are consistent with the conclusions

drawn by Marchal and Branlant (29) from kinetic results obtained on the R124L, R301L, and R459I GAPNs.

Evidence for Cofactor Reduction within the Crystals. As a first approach to characterize the redox state of the cofactor within the crystalline ternary complex, microspectrofluorimetry experiments were performed on single crystals of E268A-GAPN holoform before and after incubation with the substrate, D-G3P. However, single crystals of the holoenzyme in the absence of D-G3P exhibited unexplained fluorescence emission spectra whose shape and intensity in the 400–500 nm region prevented any subsequent measurement of spectral changes caused by NADPH production during the acylation process. This fluorescence emission is not due to a charge-transfer complex between the catalytic C302 and the NMN moiety of the NADP⁺. Indeed, no absorption band is observed between 330 and 360 nm, and alkylation of the C302 by iodoacetamide (results not shown) does not abolish the fluorescence emission. The simultaneous quantification of the oxidized and reduced forms of the cofactor within the crystals was therefore carried out by HPLC analysis. For crystals soaked with G3P, a NADPH/NADP⁺ ratio of 24 was found and clearly established that the acylation process took place within the crystals. Indeed, given the very strict substrate specificity of GAPN, the formation of NADPH cannot arise from other aldehydes that might have been present in the crystallization solution and reacted during the time course of the crystallization experiment. This point was further confirmed by control experi-

Table 3: Polar Interactions between the Cofactor and Neighboring Residues^a

NADP	E268A/NADP/G3P ConfA	E268A/NADP/G3P ConfB	C302S/NADP/G3P
NA6	D229-OD2 (2.75 Å)	D229-OD2 (2.75 Å)	D229-OD2 (3.24 Å)
OA2*	K192-NZ (3.13 Å)	K192-NZ (3.13 Å)	K192-NZ (2.82 Å)
OAP2	T195-NH (2.75 Å) wat 630 (2.77 Å)	T195-NH (2.75 Å) wat 630 (2.77 Å)	T195-NH (2.68 Å)
OAP3	G226-NH (3.12 Å) T195-OG1 (2.54 Å)	G226-NH (3.12 Å) T195-OG1 (2.54 Å)	G226-NH (3.34 Å) T195-OG1 (3.13 Å)
OA3*	S166-O (3.32 Å)	S166-O (2.96 Å)	S166-O (3.09 Å) K192-NZ (3.54 Å)
OA1	S246-OG (2.66 Å)	S246-OG (2.60 Å) S246-NH (2.60 Å)	S246-OG (2.75 Å) S246-NH (3.02 Å)
OA2	wat 248 (2.74 Å)	wat 248 (3.18 Å)	
O3		S246-NH (3.38 Å)	S246-NH (3.47 Å) S246-OG (3.64 Å)
ON1	wat 248 (2.93 Å)	wat 248 (3.24 Å)	
ON2		F168-NH (3.16 Å)	
ON2*		E399-OE1 (2.61 Å)	E399-OE1 (3.65 Å)
ON3*		L267-CO (3.60 Å)	

^a Because the reduced nicotinamide ring is not very well-defined in the electron-density map, putative interactions with the protein residues are not listed.

ments with unsoaked crystals for which no NADPH was detected.

Conformation of the Reduced Cofactor Molecule. The conformation of the oxidized NADP⁺ molecule and its interactions with the enzyme has been described for the wild-type enzyme by Cobessi et al. (15). As found for other ALDHs (14, 16, 30, 31), the cofactor straddles the Rossmann fold. The adenosine moiety is bonded in a hydrophobic pocket located between helices α_7 and α_8 , while the nicotinamide moiety is surrounded by the loop connecting β -strand J to α -helix 8, the loop located between the helix α_9 and the β -strand M, containing the catalytic C302, and the loop connecting the cofactor-binding domain to the catalytic one.

In the structure described here, the adenosine 2'-phosphate mononucleotide phosphate moiety of the NADPH molecule is well-defined in the ($3F_o - 2F_c$) electron-density maps in the four monomers. It adopts a unique conformation with full occupancy and develops the same interactions with the protein residues (Table 3) as those already described for the wild-type holoenzyme (15) and in the noncovalent ternary complex (11). The electron density in the difference maps becomes poorer from the NMNH phosphate group to the nicotinamide ring, which highlights that the NMNH moiety is more disordered. Nevertheless, the electron density still clearly shows two positions for the NMNH phosphate group and allowed us to build two conformations (called ConfA and ConfB, Figure 2), which were refined with an occupancy factor of 0.5 each. Between these two conformations, the position of the phosphate of the NMNH moiety is shifted 1.5 Å and two rotations bring the ribose of the NMNH moiety at two radically different positions, in which the two O3* atoms and the two O2* atoms are separated by 11.3 and 9.1 Å, respectively (Figure 2). The switch between ConfA and ConfB is allowed by a 90° rotation around the NP-O5* bond and a 110° rotation around the O5*-C5* bond. In ConfA, the ribose of the NMNH moiety and the nicotinamide point toward the protein surface, while they are more bulky in ConfB.

The main point here is that, whatever the conformation considered, the positioning of the NMNH moiety differs

clearly from that of the NMNH moiety depicted for the noncovalent C302S/NADP⁺/G3P ternary complex² (Figure 3) (11) or for other ALDHs (16–18). When compared to the noncovalent ternary complex, ribose of the NMNH moiety rotated in ConfA nearly 70° around the NP-O5* bond and rotated in ConfB approximately 120° around the C4*-C5* bond.

DISCUSSION

Crystal structures of several members of the ALDH superfamily have revealed an apparent flexibility for the NMNH(H) moiety of the cofactor. This flexibility has been hypothesized to constitute an essential feature of the catalytic mechanism and to be correlated with the two-step mechanism, because the conformation of the cofactor required for the acylation step is not appropriate to allow the conserved E268 to position and activate the water molecule for nucleophilic attack on the thioacyl-enzyme intermediate during the deacylation step.

This paper describes for the first time the structure of a covalent ternary complex corresponding to the thioacyl-enzyme intermediate for a member of the ALDH superfamily and provides strong structural evidence of the conformational changes of the cofactor molecule required for the deacylation step. To obtain this complex, we used a GAPN enzyme, in which the active-site E268 was substituted by an alanine. The crystals of the E268A-GAPN were grown in the presence of an excess of NADP⁺ and soaked in the mother liquor containing the substrate prior to flash-freezing. HPLC analyses assessed that reduction of the cofactor had indeed occurred within the crystal. The ternary complex structure reveals that the substrate is bound in the four monomers and possesses the geometric features expected for a thioacyl-enzyme intermediate. It highlights that reduction of the coenzyme leads to an extensive motion of the NMNH moiety, undescribed thus far, which shifts the reduced pyridinium ring away from the active site.

Double Conformation of the Catalytic C302 and NADPH. As described in the Results, the catalytic C302 and the NMNH moiety of the cofactor both adopt two conformations in each monomer of the present structure. In regard to the catalytic C302, electron-density map analysis allowed us to assign one conformation to the cysteine side chain bonded to the substrate and the second one to the free cysteine side chain. Although this second conformation could have been explained as first glance by the presence of a population of enzyme molecules that has not undergone the catalytic process, this hypothesis seems rather unlikely for the following reasons. First, the acylation rate is fast (210 s⁻¹ in the solution state and should still be efficient in the crystalline state), and analysis of the electron-density map did not allow us to observe the presence of NADP⁺ in the hydride-transfer position, as expected if the acylation step had not occurred yet. Second, the NADPH/NADP⁺ ratio of 24 strongly supports cofactor reduction within the crystals.

² Note that, in this former structure, the nicotinamide ring that was not well-defined in the electron-density map had been placed in syn instead of the anti position expected from the stereospecificity of hydride transfer. However, it does not change the conclusion drawn here because, whatever the position, syn or anti, the NMN moiety adopts a conformation incompatible with the deacylation step.

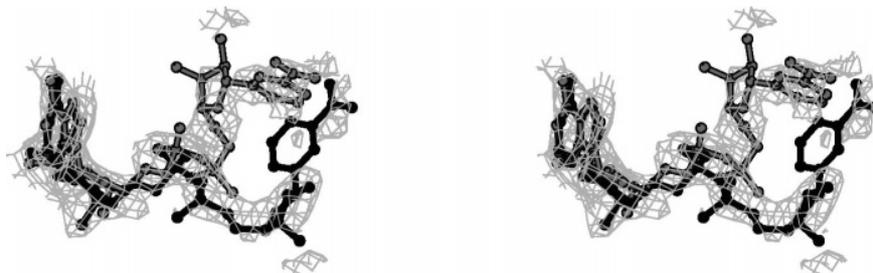


FIGURE 2: Stereoview of the two conformations of the cofactor molecule (monomer C) in a $(3F_o - 2F_c)$ electron-density map (contour level, 1σ). In black, ConfB; and in light gray, ConfA.

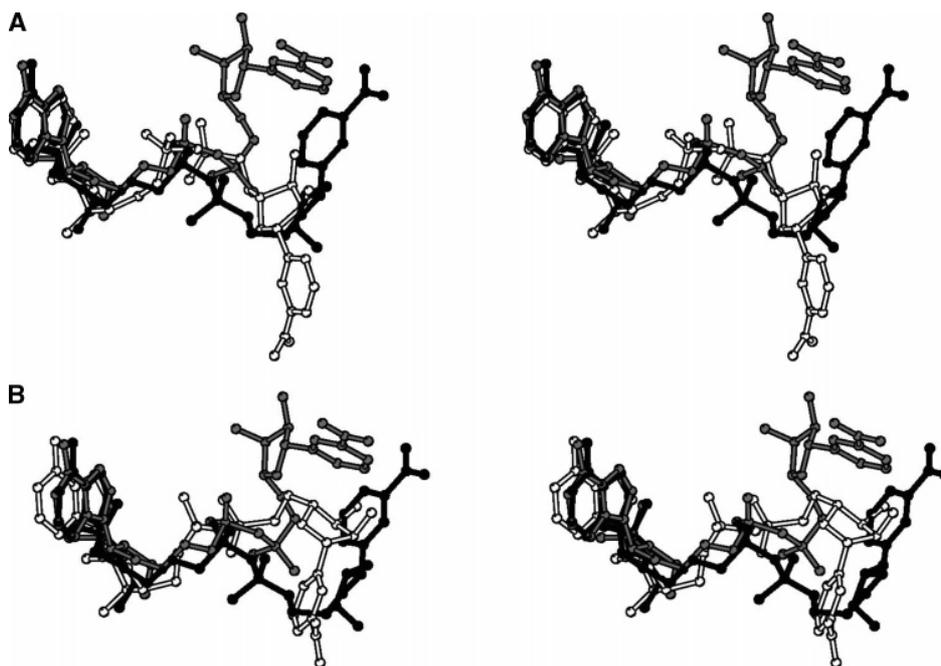


FIGURE 3: Stereoview of the two NADPH conformations (in black, ConfB; and in light gray, ConfA) superimposed (A) with NADP^+ in the noncovalent ternary complex (represented in white, from ref 11) and (B) with NADH as observed in the human ALDH2/NADH binary complex (represented in white, from ref 18).

Third, the observed conformation of C302 is not the one found in the holoenzyme structure but in the apostructure while the cofactor is bound with a full occupancy. Given that GAPN from *S. mutans* follows the same ordered sequential mechanism as human or other ALDHs (4, 5), where NAD(P)H release constitutes the last step of the reaction after product release, these observations therefore suggest that this conformation of C302 is rather corresponding to an enzyme population for which the reaction has reached a further stage, including hydrolysis of the thioacylzyme and subsequent product release, but where the reduced coenzyme is still bound.

Conformation of the NMN(H) Moiety and Comparison with Those Found in Other ALDH Structures. Crystal structures of human ALDH2 in the binary complex with either NAD^+ or NADH showed that the oxidized form of the coenzyme rather adopts an extended conformation compatible with the hydride transfer, whereas the reduced form exhibits a contracted conformation that was hypothesized to be suitable for enzyme hydrolysis (18). In the case of GAPN, the structure of a noncovalent ternary complex, C302S/ NADP^+ /G3P (11), already reported the conformation of NADP^+ at the ground-state level (Michaelis complex). In this structure, the substrate was well-oriented for an

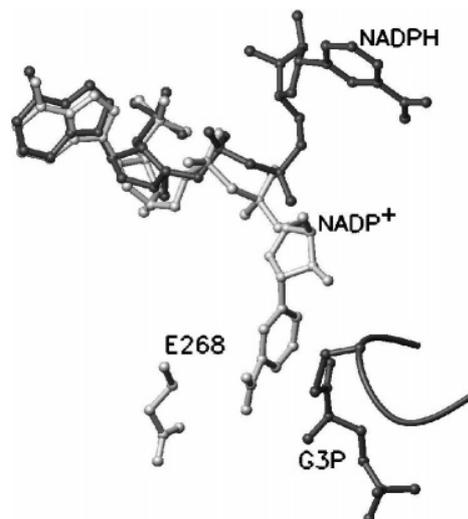


FIGURE 4: Superimposition of the noncovalent ternary complex (hydride transfer conformation, 11) and the thioacylzyme intermediate (ConfA, this study) showing the cofactor conformation during the acylation and deacylation steps.

efficient acylation step, but as observed for human ALDH2, this conformation could not be suitable for the deacylation

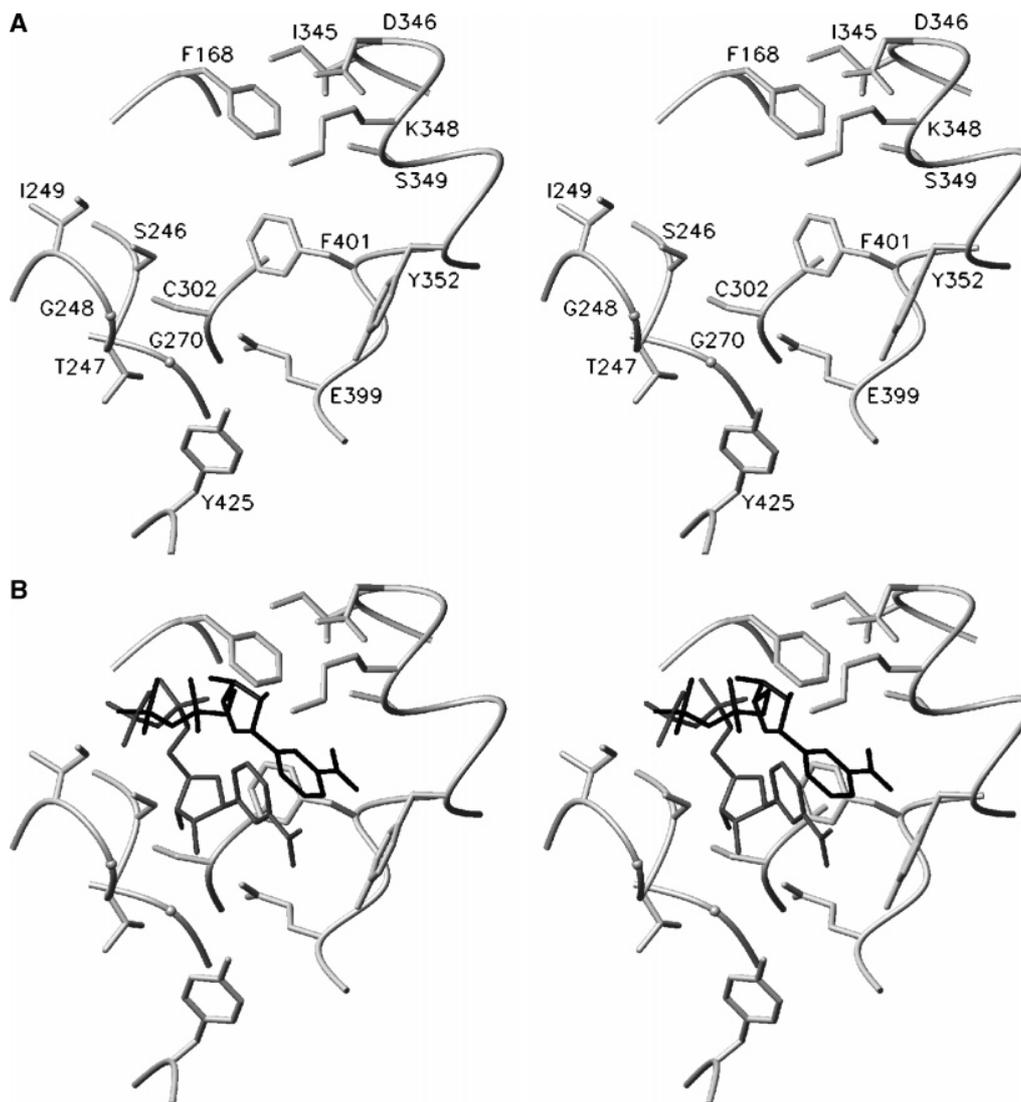


FIGURE 5: Stereoview of the cavity constituting the binding pocket of the NMNH moiety (A) in the absence of the cofactor and (B) with the two conformations of the reduced cofactor molecule.

step because the nicotinamidium ring blocks the way and prevents E268 to position and activate the water molecule for the deacylation step (Figure 4). Because NADPH release constitutes the last step of the reaction, it seemed reasonable to postulate that, in GAPN-ALDH, the NMNH moiety must also be displaced for a proper activation of the deacylating water molecule by residue E268 in the second step of the reaction (deacylation step).

In the present structure that can be described as a mixture of a thioacylenzyme intermediate and a binary enzyme/NADPH complex, the conformations found for the NMNH moiety of NADPH indeed differ from that observed for the NMN moiety of NADP⁺ in the Michaelis complex C302S/NADP/G3P and are shifted away from the catalytic site. Moreover, their positioning strongly differ from the "hydrolysis" conformation described by Perez-Miller and Hurley (18) for human ALDH2 in complex with NADH (Figure 3B). Although this difference might only further reflect the high mobility of the NMNH moiety that can adopt multiple alternative conformations, a thorough comparison between the two structures reveals that, in the human ALDH2 binary

NADH complex, the oxygen atom of the amidic group from the reduced pyridinium (NO7 atom) is postulated to be hydrogen-bonded to the side chain of N169. In contrast, in the GAPN thioacylenzyme intermediate, the oxygen atom at C1 of the substrate occupies this position and interacts with the N169-ND2 atom, which is known to constitute, together with the catalytic C302 amide nitrogen, the oxyanion hole required not only for the hydride transfer but also for the stabilization of the different intermediates during the catalytic cycle. On the basis of the modeling experiment, Perez-Miller and Hurley (18) suggested that the hydrolysis conformation of NADH in ALDH2 might be compatible with an acylated enzyme species. In our case, reduction of the coenzyme molecule has occurred within the crystals in the presence of the natural substrate. Therefore, this structure likely constitutes a reasonable picture of the thioacylenzyme intermediate for the physiological reaction.

Isomerization of the NMN(H) Moiety of the Cofactor Molecule. In the noncovalent ternary complex (11) representative of the hydride transfer conformation, the nicotinamide ring was flanked by the side chain of the catalytic

C302 on one side and by the side chain of residue T244 on the other side. Once the thioacyl enzyme has been formed and the cofactor has been concomitantly reduced (this study), the NMNH moiety is found in a cavity, delineated by residues F168, S246–I249, G270, I345, D346, K348, S349, Y352, E399–F401, and Y425 (Figure 5). Superimposition of the structures of these two complexes highlights the fact that the NMNH movement does not require any noticeable conformational change of the protein structure. This is probably explained by the peculiar mode of binding of the cofactor in this family (11 and references therein) and by the fact that the cavity is wide enough to accommodate the NMNH moiety. Inspection of the 3D structures currently available reveals that this cavity is also present in other nonphosphorylating CoA-independent ALDHs and involves conserved residues. We therefore propose that it constitutes the pocket occupied by the NMNH moiety during the deacylation step for the other members of the nonphosphorylating CoA-independent ALDH family. Because this cavity opens to the exterior, it might constitute the exit door for NAD(P)H as well.

As already mentioned, the isomerization of the cofactor should occur after the oxidoreduction step to allow the catalytic E268 to play its role in the deacylation step. This is supported by the relative positioning of the NMN moiety of NADP⁺ toward E268 as deduced from the inspection of the 3D structures of numerous ALDH–NAD(P)⁺ (13–17) complexes and of the ternary complex C302S GAPN–NADP⁺–G3P (11). The latter complex is likely representative of the structure of the wild-type ternary Michaelis complex. Indeed, using W397 as a conformational kinetic probe, binding of G3P to the C302S GAPN–NADP⁺ complex was shown to induce a conformational reorganization of the active site similar to that observed on C302A GAPN (32 and unpublished results) and on the wild type. Nonetheless, the question concerning the molecular factors and the driving force, which promote isomerization of the cofactor, remains to be addressed. In the binary complex GAPN–NADP⁺, it is probable that the presence of the thiolate form of C302 near the positive charge of the pyridinium ring of NADP⁺ is one of the factors that favors a NMN moiety conformation suitable for hydride transfer. However, in the transient thiohemiacetal enzyme intermediate in which C302 is engaged in a covalent linkage, additional interactions should stabilize the NADP⁺ “hydride” conformation. One of them could be the negative charge of the oxyanion of the thiohemiacetal intermediate, which is never protonated within the active site. Moreover, as soon as the hydride transfer occurs, the loss of the positive charge of the pyridinium ring and the nonplanar conformation of the dihydropyridine ring likely participate in triggering the NMNH conformational isomerization process. However, a low energetic barrier is likely existing between the conformations adopted by NADP(H) within GAPN during the catalytic cycle. Indeed, we recently solved the structure of a GAPN mutant protein in complex with NADP⁺, in which the catalytic C302 has been substituted by an arginine (D’Ambrosio et al., unpublished data), a residue naturally encountered at this position in some Ω crystallins (33, 34). In this structure, the R302 residue was found to mimic quite well the shape of the substrate covalently bound to the catalytic C302, and surprisingly enough, we observed that despite the

oxidized state of the cofactor, its NMN moiety was located in the same position as that depicted here for the NMNH moiety in the thioacyl enzyme structure.

Evolutionary Viewpoint. The data presented above show how the NMN(H) moiety of the cofactor displays different conformations throughout the catalytic cycle of GAPN. This likely constitutes a specific feature of all nonphosphorylating CoA-independent ALDHs. In the “hydride-transfer” conformation, the positioning of the NMN moiety prevents the E268 from playing its role in the deacylation process. Therefore, either the NMNH moiety flips or the reduced cofactor dissociates before the hydrolysis process. Clearly, our structural study supports the “flipping” mechanism that is also in accordance with the ordered sequential nature of the kinetic mechanism in which NAD(P)H dissociates last. The picture is clearly different for other ALDH families. Indeed, for the phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which is a representative member of the phosphorylating ALDH family, characterization of its mechanistic and structural properties has highlighted major differences in terms of cofactor binding mode and kinetic mechanism. First, the NAD(H) binding mode to the canonical Rossmann fold does not allow the NMN(H) moiety to adopt different conformations during the two-step mechanism. Second, kinetic data support a ping-pong mechanism in which a cofactor exchange step (NADH release/NAD⁺ binding) precedes the nucleophilic attack by inorganic phosphate (35), although there is no steric hindrance that can prevent the phosphorylation of the thioacyl enzyme/NADH complex. In fact, the cofactor exchange step would be a prerequisite for accelerating the rate of phosphorylation by increasing the reactivity of the thioacyl enzyme intermediate toward inorganic phosphate. Finally, kinetic data obtained on two members of the nonphosphorylating CoA-dependent ALDH family, i.e., the acetaldehyde dehydrogenase and the succinate semialdehyde dehydrogenase, support a ping-pong mechanism in which NADH release precedes CoA binding (2, 3). Whether the reduced cofactor blocks the way for the nucleophilic attack by the CoA molecule or NADH and CoA binding sites overlap, at least partially, remains to be determined. From the three examples cited above, it clearly appears that evolution has led to different solutions to achieve a similar two-step mechanism in ALDHs.

REFERENCES

1. Segal, H. L., and Boyer, P. D. (1953) The role of sulfhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 204, 265–281.
2. Shone, C. C., and Fromm, H. J. (1981) Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 20, 7494–7501.
3. Söhling, B., and Gottschalk, G. (1993) Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate–semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*, *Eur. J. Biochem.* 212, 121–127.
4. Marchal, S., Rahuel-Clermont, S., and Branlant, G. (2000) Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 39, 3327–3335.
5. Sheikh, S., Ni, L., Hurley, T. D., and Weiner, H. (1997) The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 272, 18817–18822.
6. Farres, J., Wang, T. T., Cunningham, S. J., and Weiner, H. (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver

- mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 34, 2592–2598.
7. Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L., and Meighen E. (1995) Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP⁺-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*, *Biochemistry* 34, 16725–16732.
 8. Wang, X., and Weiner, H. (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 34, 237–243.
 9. Vedadi, M., and Meighen E. (1997) Critical glutamic acid residues affecting the mechanism and nucleotide specificity of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 246, 698–704.
 10. Marchal, S., and Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 38, 12950–12958.
 11. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *J. Mol. Biol.* 300, 141–152.
 12. Marchal, S., and Branlant, G. (2001) Engineered nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase at position 268 binds hydroxylamine and hydrazine as acyl acceptors, *Eur. J. Biochem.* 268, 5764–5770.
 13. Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., and Wang, B. C. (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold, *Nat. Struct. Biol.* 4, 317–326.
 14. Johansson, K. El-Ahmad, M. Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., and Eklund, H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution, *Protein Sci.* 7, 2106–2117.
 15. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (1999) Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *J. Mol. Biol.* 290, 161–173.
 16. Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, D. T. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion, *Structure* 5, 701–711.
 17. Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., and Baker, E. N. (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: The structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases, *Structure* 6, 1541–1551.
 18. Perez-Miller, S. J., and Hurley, T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 42, 7100–7109.
 19. Lorentzen, E., Hensel, R., Knura, T., Ahmed, H., and Pohl, E. (2004) Structural basis of allosteric regulation and substrate specificity of the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*, *J. Mol. Biol.* 341, 815–828.
 20. Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charrault, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P., and Ferrer, J. L. (2002) FIP: A highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 58, 805–814.
 21. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
 22. 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. (1998) Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
 23. Roussel, P. A., and Cambillau, C. (1991) TURBO-FRODO, Silicon Graphics Applications Directory, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
 24. Laskowsky, R. A. MacArthur, M. W. Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
 25. Esnouf, R. M. (1999) Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 55, 938–940.
 26. Koradi, R., Billeter, M., and Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* 14, 51–55.
 27. Brzozowski, A. M., and Walton, J. (2001) Clear strategy screens for macromolecule crystallisation, *J. Appl. Crystallogr.* 34, 97–101.
 28. Rossmann, M. G., Moras, D., and Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein, *Nature* 250, 194–199.
 29. Marchal, S., and Branlant, G. (2002) Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *J. Biol. Chem.* 277, 39235–39242.
 30. Lamb, A. L., and Newcomer, M. E. (1999) The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: Implications for retinal specificity, *Biochemistry* 38, 6003–6011.
 31. Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E., and Vrielink, A. (2000) Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: Structural implications for cofactor specificity and affinity, *Biochem. J.* 349, 853–861.
 32. Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tête-Favier, F., Aubry, A., and Branlant, G. (2001) Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Chem.-Biol. Interact.* 130–132, 15–28.
 33. Montgomery, M. K., and McFall-Ngai, M. J. (1992) 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.* 267, 20999–21003.
 34. Zinovieva, R. D., Tomarev, S. I., and Piatigorsky, J. (1993) Aldehyde dehydrogenase-derived ω -crystallins of squid and octopus. Specialization for lens expression, *J. Biol. Chem.* 268, 11449–11455.
 35. Harrigan, P. J., and Trentham D. R. (1974) Kinetic studies on oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-facilitated reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Biochem. J.* 143, 353–363.

BI0515117

1. Etude de l'environnement protéique autour du résidu E268

Les études antérieures réalisées au laboratoire avaient mis en évidence le rôle essentiel du résidu E268 dans le positionnement et l'activation de la molécule d'eau impliquée dans l'étape d'hydrolyse de l'intermédiaire thioacylenzyme. De plus, il avait été montré qu'il jouait un rôle de catalyseur basique à des pH où il est déprotoné (c'est-à-dire supérieurs 7,6). Au début de mon projet, rien n'était connu concernant les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans l'activation et le positionnement de E268. L'examen de la structure cristalline de la forme "Apo2", considérée comme représentative de la forme biologiquement active, révélait que ce résidu était localisé dans un environnement protéique essentiellement composé de résidus à chaînes latérales hydrophobes, à savoir L174, T244, L427 et F465 (Figure 17).

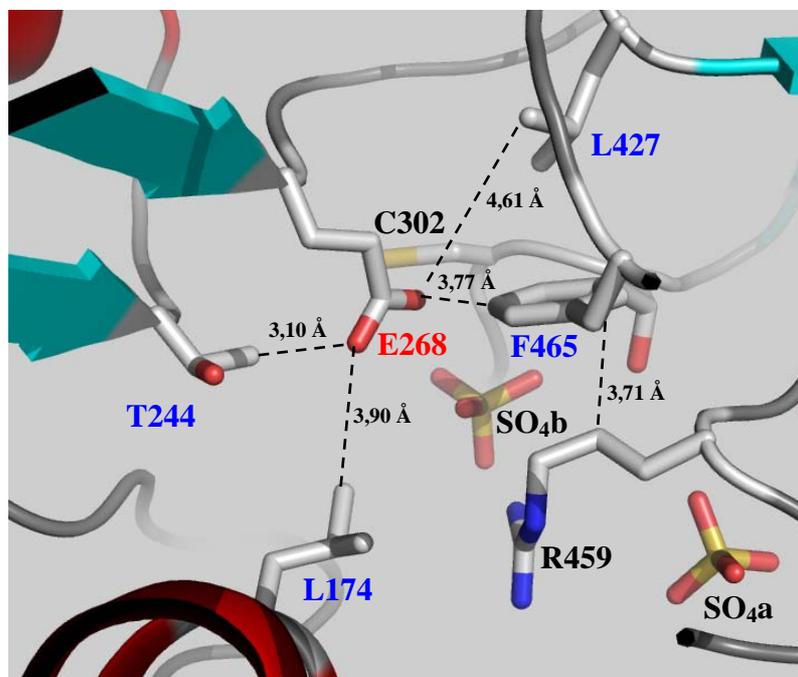


Figure 17 : Représentation schématique de l'environnement protéique autour du résidu E268 dans la structure cristalline de la forme Apo2 de la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi *et al.*, 2000).

Les résidus L427, R459, F465 sont localisés dans des boucles et les résidus T244 et E268 à l'extrémité C-terminale d'un brin β , le résidu L174 est retrouvé dans une hélice α , alors que la C302 catalytique est retrouvée au niveau d'un coude β . Les distances sont mentionnées à titre indicatif.

Afin de caractériser le rôle de ces résidus, notre stratégie a consisté à supprimer plus ou moins totalement le caractère hydrophobe des chaînes latérales. Nous avons donc généré les mutants L174A, L427G, F465Y, F465L et F465G puis étudié l'impact de ces substitutions sur la catalyse. L'introduction d'une glycine ou d'une alanine devait permettre de moduler le caractère hydrophobe des chaînes latérales. L'introduction d'une tyrosine devait, par la présence de la fonction hydroxyle, modifier éventuellement le pK_{app} du résidu E268.

L'examen de la structure cristalline de la forme "Apo2" suggère également un rôle additionnel pour le résidu F465. En effet, le noyau phényle de la chaîne latérale du résidu F465 pourrait participer au positionnement du résidu R459 par le biais de contacts de Van der Waals établis avec la partie aliphatique de la chaîne latérale de ce résidu, et par conséquent être impliqué dans la formation d'un complexe Michaélien efficace. En effet, comme mentionné dans la partie Introduction pages 44-45, notre équipe avait montré que le résidu R459 stabilise la fixation du G3P et favorise son positionnement adéquat au sein du complexe ternaire, sans doute indispensable pour une attaque efficace du thiolate de la C302 sur la fonction aldéhyde en C₁ (Marchal et Branlant, 2002). Cette hypothèse demandait à être validée car les facteurs d'agitation thermique (facteurs B) des atomes constituant la chaîne latérale du résidu R459 sont trois fois plus élevés que le facteur B moyen de l'ensemble des atomes de la protéine, suggérant une flexibilité importante de cette chaîne latérale. C'est donc dans ce but que les mutants F465L et F465G ont été générés. L'introduction d'un résidu leucine nous permettait de conserver le caractère hydrophobe de la chaîne latérale sans conserver le caractère plan mais avec une flexibilité beaucoup plus importante que le noyau phényle, alors que la présence d'un résidu glycine supprimait toute interaction potentielle 465/459.

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, le résidu T244 fait partie de l'environnement protéique du résidu E268 *via* le groupement β -CH₃ de sa chaîne latérale. Les résultats mentionnés dans la publication 1 montrent que ce résidu joue un rôle essentiel au niveau de l'étape d'acylation. Cette étape étant devenue limitante pour les mutants T244S et T244V, il n'était donc pas possible d'étudier la contribution du résidu T244 dans l'activation et/ou le positionnement du résidu E268 au niveau de l'étape de désacylation.

1.1. Etudes des propriétés catalytiques des mutants générés

Comme il est mentionné dans la publication 1, page 58, il avait été montré que pour la GAPN de type sauvage, les étapes d'acylation et de désacylation pouvaient être résolues cinétiquement et que l'étape limitante de la réaction était associée à l'étape de désacylation. Il avait également été démontré que le processus limitant au sein de l'étape de désacylation était associé à l'hydrolyse et que le transfert d'hydrure était cinétiquement déterminant dans l'étape d'acylation. Les mêmes études avaient permis de montrer que pour l'étape d'acylation, la vitesse associée (k_{ac}) et le K_M pour le G3P étaient augmentés d'un facteur environ 10 par rapport aux valeurs de k_{cat} et de K_M déterminées à l'état stationnaire.

Pour permettre une comparaison pertinente des effets observés sur les propriétés catalytiques des mutants, il était d'abord nécessaire de déterminer si, comme pour le type sauvage, l'étape limitante restait associée à l'étape de désacylation et que le processus cinétiquement déterminant au sein de l'étape d'acylation restait associé au transfert d'hydrure. Pour le premier point, des tests ont été réalisés en cinétique rapide en présence de deux concentrations en enzyme (8 μ N et 16 μ N) et à 25°C. Dans ces conditions expérimentales, un saut de production de NADPH proportionnel à la quantité d'enzyme est observé pour les mutants L427G, F465Y et F465L. Ceci montre que l'étape de désacylation reste limitante pour ces trois mutants. Par contre, aucun saut n'est observé pour les mutants L174A et F465G indiquant que l'étape limitante de la réaction est alors associée à l'acylation. Pour le second point, nous avons réalisé des mesures d'effets isotopiques de substrat en présence de D-[1-²H]-G3P au pH optimum de la réaction (8,2). Si un effet isotopique de substrat est mesuré, alors le processus cinétiquement déterminant au sein de l'étape d'acylation reste associé au transfert d'hydrure. Par contre, si aucun effet isotopique de substrat n'est mesuré, alors ce processus précède le transfert d'hydrure. Ainsi, nous avons montré que dans le cas des mutants L174A et F465Y le transfert d'hydrure n'était plus le processus cinétiquement déterminant au sein de l'étape d'acylation.

Les paramètres cinétiques déterminés à l'état stationnaire pour l'ensemble des mutants sont rassemblés dans le tableau 1.

	(D,L)-G3P			NADP	Etape limitante
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	K_I (μM)	K_M (μM)	
Type sauvage ⁽¹⁾	60 ± 1	46 ± 1	540 ± 20	25 ± 2	Désacylation
Type sauvage ⁽²⁾	210 ± 5 ⁽²⁾	500 ± 15 ⁽²⁾	ND	26 ± 2	Désacylation
L174A	2,5 ± 0,1	157 ± 39	210 ± 50	23 ± 2	Acylation
L427G	1,00 ± 0,05	70 ± 8	-	7 ± 2	Désacylation
F465G	(8 ± 0,2).10 ⁻³	192 ± 50	1150 ± 390	510 ± 8	Acylation
F465Y	4,00 ± 0,02	26 ± 6	ND ⁽³⁾	50 ± 4	Désacylation
F465L	21,0 ± 0,6	< 100 ⁽⁴⁾	ND ⁽³⁾	18 ± 2	Désacylation

Tableau 1 : Paramètres cinétiques déterminés à l'état stationnaire pour les différents mutants de la GAPN de *S. mutans*. La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à 25°C dans un tampon TES 50 mM/β-mercatoéthanol 5 mM à pH 8,2. Les résultats expérimentaux ont été analysés suivant le modèle classique de Michaelis-Menten (équation 1, page 117) et selon l'équation avec inhibition compétitive par le substrat (D,L)-G3P pour tous les mutants excepté le mutant L427G.

⁽¹⁾ : Paramètres cinétiques déterminés à 25°C en présence de D-G3P en cinétique classique pour l'étape de désacylation (Marchal *et al.*, 2000).

⁽²⁾ : Paramètres cinétiques déterminés à 10°C pour l'étape d'acylation (Marchal *et al.*, 2000).

ND⁽³⁾ : Paramètres cinétiques non déterminés car l'effet inhibiteur est trop important pour permettre l'ajustement des valeurs expérimentales à l'équation utilisée (équation 2, page 117).

ND⁽⁴⁾ : Valeur approximative, les données n'ayant pu être ajustées avec une précision suffisante. Cependant, les expériences menées montrent clairement que l'activité maximale est obtenue à une concentration de 0,2 mM en (D,L)-G3P, comme pour le type sauvage.

1.2. Mutant L174A

Comme mentionné précédemment, l'acylation est devenue l'étape cinétiquement limitante de la réaction globale pour le mutant L174A et le transfert d'hydrure n'est plus le processus cinétiquement déterminant au sein de l'étape d'acylation.

La substitution L174A conduit à une diminution d'un facteur 320 de la vitesse associée à l'étape d'acylation. De même, le K_M du (D,L)-G3P est diminué d'un facteur 3 par rapport au type sauvage alors que le K_M du NADP n'est pas modifié. Le fait que le processus cinétiquement déterminant soit associé à une étape précédent le transfert d'hydrure indique que les vitesses associées aux processus conduisant à la formation de l'intermédiaire hémithioacétal sont diminuées au minimum d'un facteur 320 par rapport au type sauvage. Ces processus incluent la formation du complexe ternaire GAPN/NADP/G3P avec notamment la reconnaissance du substrat D-G3P et l'attaque de la C302 sur la fonction aldéhyde. Cette diminution de vitesse pourrait être due à une attaque non efficace de la C302 essentielle sur la fonction aldéhyde du G3P, liée par exemple à un positionnement relatif non optimal de la C302 et de la fonction aldéhyde dans le complexe Michaélien, ou à un pK_{app} nettement plus

élevé de la C302. Afin de valider ou d'exclure cette dernière hypothèse, une étude de la variation du k_{ac} en fonction du pH a été entreprise. Le profil obtenu est une monsigmoïde dépendante d'un pK_{app} de 7,2 qui correspond à celui de la C302 (Figure 18). La substitution L174A conduit donc à une augmentation du pK_{app} de la C302 d'une unité par rapport au type sauvage, ce qui ne peut expliquer les effets cinétiques observés. Par contre, cette approche cinétique ne permet pas d'atteindre le pK_{app} du résidu E268, à moins que celui-ci ne soit proche de 7,2. L'ensemble de ces résultats et le fait qu'aucune augmentation de l'affinité apparente pour le G3P ne soit observée avec ce mutant (le K_M est en fait diminué d'un facteur 3 par rapport au type sauvage) favorisent plutôt l'hypothèse d'un positionnement relatif non optimal de la fonction thiolate portée par la chaîne latérale de la C302 et de la fonction aldéhyde du substrat.

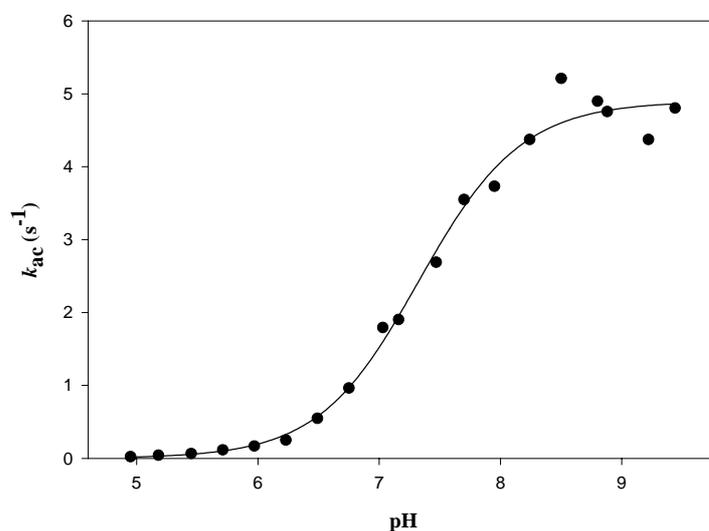


Figure 18 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation pour le mutant L174A. Les constantes de vitesses d'acylation ont été mesurées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante (0,15 M). Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 0,2 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 0,3 μ N en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{ac}) représente une moyenne d'au moins 4 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monsigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 7,2 \pm 0,2$ et $k_{ac} = 2,5 \pm 0,1 s^{-1}$. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

1.3. Mutant L427G

Pour ce mutant, l'étape limitante reste associée à la désacylation avec un k_{cat} diminué d'un facteur 37 alors que les valeurs de K_M pour le (D,L)-G3P et le NADP sont proches de celles déterminées pour le type sauvage.

La vitesse associée à l'étape d'acylation est diminuée d'un facteur 11 par rapport au type sauvage avec un k_{obs} de l'ordre de $70 s^{-1}$. Le profil de variation du k_{ac} en fonction du pH

correspond à une monosigmoïde dépendant d'un pK_{app} de 6,3 pouvant être attribué à la C302 (Figure 19). Cependant, l'instabilité du mutant dans les conditions expérimentales utilisées nous a conduit à étudier cette variation du k_{ac} sur une gamme de pH beaucoup plus restreinte (de 5,75 à 7,5). La contribution d'un second groupement ionisable de pK_{app} 7,6 correspondant au résidu E268 ne peut donc pas être exclue.

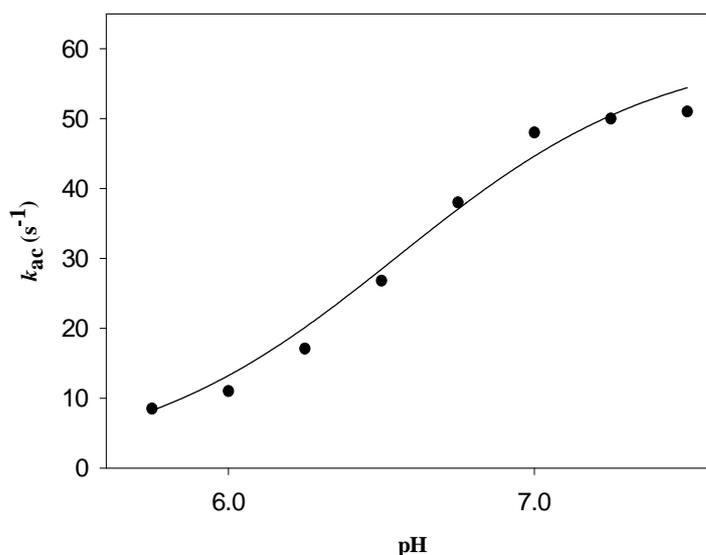


Figure 19 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation pour le mutant L427G. Les valeurs de k_{ac} ont été déterminées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante (0,15 M). Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 2 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 8 μ N en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{ac}) représente une moyenne d'au moins 5 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 6,3 \pm 0,2$ et $k_{cat} = 70 \pm 5 s^{-1}$. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

Le profil obtenu lors de l'étude de la variation du k_{cat} en fonction du pH est également une monosigmoïde dépendant d'un seul pK_{app} de 6,2 (Figure 20). La valeur identique des pK_{app} déterminée dans ces deux étapes conforte l'attribution du pK_{app} de 6,2-6,3 à la C302 ; la mutation L427G ne semble donc pas entraîner de modification de ce pK_{app} . L'ensemble de ces résultats montre également que notre approche cinétique ne permet pas de mettre en évidence une contribution du résidu E268 tant au niveau de l'étape d'acylation que de l'étape de désacylation.

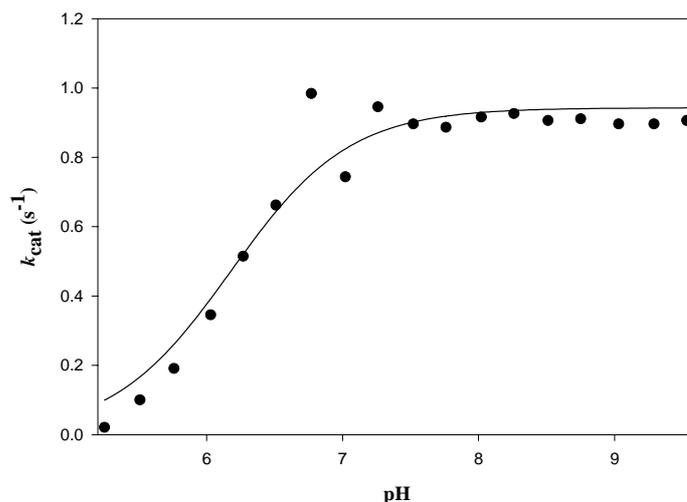


Figure 20 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape de désacylation en fonction du pH pour le mutant L427G. Les valeurs de k_{cat} ont été déterminées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante (0,15 M). Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 2 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 0,2 μ N en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{cat}) représente une moyenne d'au moins 4 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 6,2 \pm 0,1$ et $k_{cat} = 1,0 \pm 0,2$ s⁻¹. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

1.4. Mutant de la position 465

1.4.1. Mutant F465Y

L'étape limitante pour ce mutant reste associée à la désacylation. L'introduction d'un résidu tyrosine conduit à une diminution du k_{cat} d'un facteur 15 par rapport au type sauvage alors que les valeurs de K_M pour le (D,L)-G3P et le NADP sont respectivement diminuées et augmentées d'un facteur 2.

La vitesse associée à l'étape d'acylation est diminuée d'un facteur 7 par rapport au type sauvage. Les études réalisées en cinétique rapide montrent également l'absence d'effet isotopique en présence de substrat deutéré D-[1-²H]G3P à pH optimum. Ce résultat indique qu'au sein de l'étape d'acylation, le processus limitant devient associé à une étape précédant le transfert d'hydrure. La variation du k_{ac} en fonction du pH correspond une monosigmoïde dépendant d'un pK_{app} de 7,9 pour la gamme de pH allant de 6,5 à 8,75 (Figure 21). Du fait de l'instabilité de ce mutant à des pH inférieurs à 6,5, il n'a pas été possible de déterminer avec une précision suffisamment grande la valeur de k_{ac} dans cette zone de pH. Cependant, le fait que la courbe ne passe pas par l'origine (la valeur de k_{ac} déterminée à pH 6,5 est d'environ 5 s⁻¹) suggère l'implication d'un second groupement ionisable correspondant à la C302 et dont la

valeur de pK_{app} serait inférieure à 6,5. Par conséquent, le pK_{app} de 7,9 peut vraisemblablement être attribué au résidu E268, ce qui correspond à une augmentation de 0,3 unité par rapport au type sauvage.

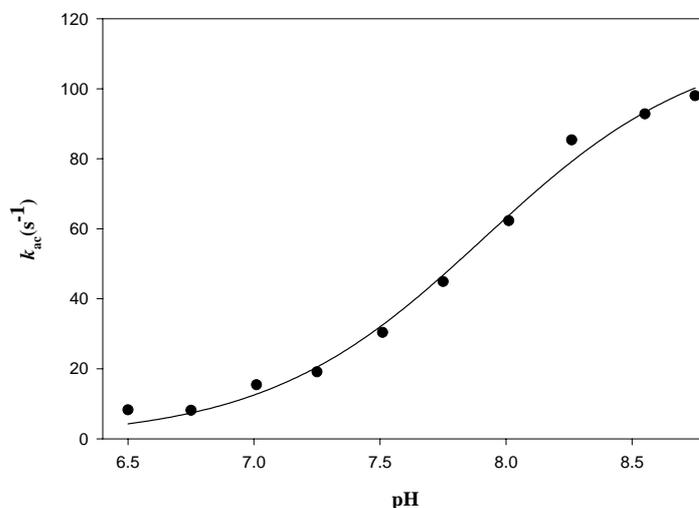


Figure 21 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation pour le mutant F465Y. Les valeurs de k_{ac} ont été déterminées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante, en présence de 250 mM de sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 2 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 8 μ N en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{ac}) représente une moyenne d'au moins 5 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 7,9 \pm 0,2$ et $k_{ac} = 115 \pm 0,1 s^{-1}$. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

Les études réalisées ont également permis de mettre en évidence une propriété particulière du mutant F465Y à savoir l'augmentation de l'amplitude du saut de production de NADPH avec le pH (Figure 22A). La variation de cette amplitude en fonction du pH correspond à une monosigmoïde dépendante d'un pK_{app} unique de 6,8 qui peut être attribué à la C302 (Figure 22B). De plus, à partir de pH 8 l'amplitude observée correspond à 90 % du saut attendu contrairement au type sauvage pour lequel seulement 40 % de l'amplitude attendue est mesurée (voir partie des résultats relative aux propriétés de coopérativité, p 88). L'ensemble de ces résultats nous conduit à proposer que le processus cinétiquement déterminant au sein de l'étape d'acylation serait associé à l'attaque nucléophile de la C302 sur le C_1 du G3P.

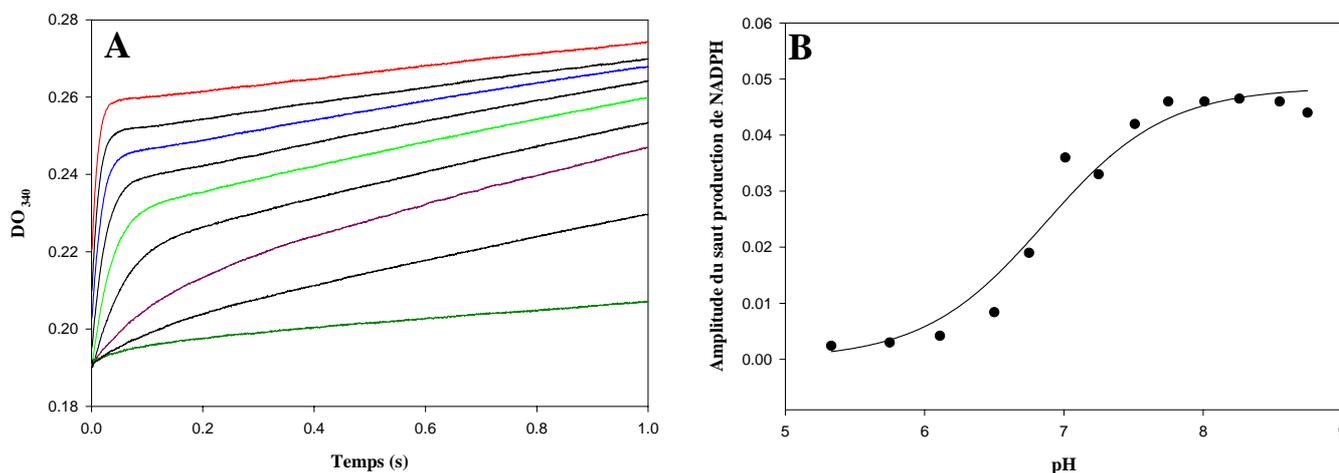


Figure 22 : A. Variation de l'amplitude du saut de production de NADPH en fonction du pH pour le mutant F465Y. Les tests sont réalisés en cinétique rapide dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante, en présence de 250 mM de sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 2 mM (D,L)-G3P et 8 μ N en sites d'enzyme. Chaque trace représente une moyenne d'au moins 5 mesures.

B. Représentation de l'amplitude du saut de production de NADPH obtenue en fonction du pH. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 6,8 \pm 0,2$. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

L'étude de la variation de la constante de vitesse associée à l'étape de désacylation en fonction du pH montre une monosigmoïde dépendante d'un seul pK_{app} de 6,6 (Figure 23). Ce pK_{app} correspond à la C302. L'introduction d'un résidu tyrosine en position 465 entraîne donc une augmentation du pK_{app} de la C302 de 0,4 unités. Par contre, notre approche cinétique ne nous a à nouveau pas permis de mettre en évidence une contribution du résidu E268 au niveau de l'étape de désacylation.

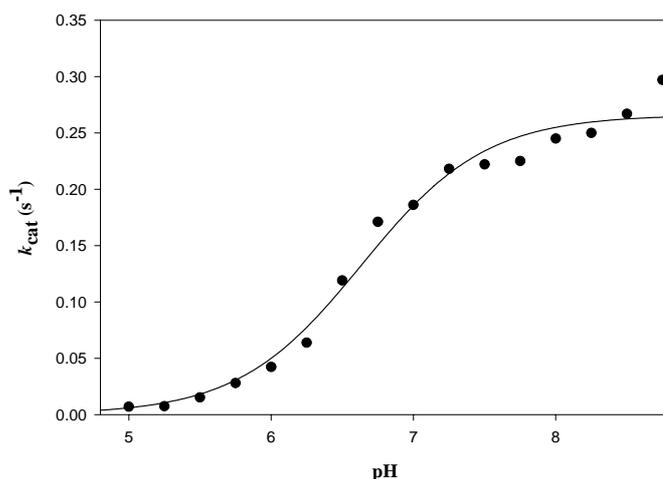


Figure 23 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape de désacylation en fonction du pH pour le mutant F465Y. Les valeurs de k_{cat} ont été déterminées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante (0,15 M). Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 0,6 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 0,2 μ N en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{cat}) représente une moyenne d'au moins 4 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $pK_{app} = 6,6 \pm 0,1$ et $k_{cat} = 0,26 \pm 0,2$ s⁻¹. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

1.4.2. Mutant F465L

L'étape limitante pour ce mutant reste associée à la désacylation. Le k_{cat} est diminué d'un facteur 3 par rapport au type sauvage alors que l'affinité apparente pour le NADP n'est pas modifiée. Par contre, la valeur du K_M pour le G3P n'a pu être déterminée avec précision car l'effet inhibiteur par excès de substrat est si marqué qu'aucune équation ne nous a permis d'ajuster correctement nos données expérimentales. Cependant, nous avons pu montrer que la concentration optimale de G3P à utiliser lors des tests d'activité est de 0,2 mM, comme dans le cas de l'enzyme sauvage.

L'étude de la variation de la constante de vitesse associée à l'étape de désacylation en fonction du pH conduit à l'obtention d'une monosigmoïde dépendante d'un $\text{p}K_{\text{app}}$ unique de 8,6 (Figure 24). Malheureusement, aucune étude de l'étape d'acylation en fonction du pH n'a pu être réalisée puisque la protéine s'est révélée instable lors des expériences de cinétique rapide. De même, la détermination du $\text{p}K_{\text{app}}$ de la C302 par une sonde chimique telle que le 2-PDS n'a pu être réalisée pour les mêmes raisons.

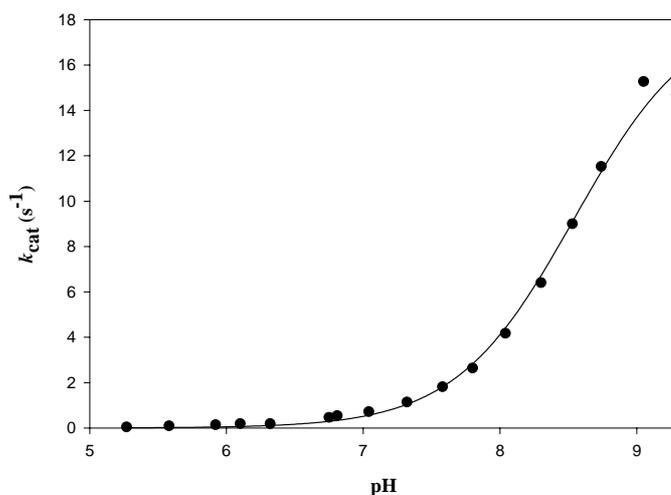


Figure 24 : Variation de la constante de vitesse associée à l'étape désacylation pour le mutant F465L. Les valeurs de k_{cat} ont été déterminées dans une gamme de pH variable avec un polytampon Acétate 30 mM, Imidazole 30 mM, Tricine 120 mM de force ionique constante (0,15 M). Les concentrations utilisées pour l'expérience sont les suivantes : 1 mM NADP, 0,6 mM (D,L)-G3P (concentration saturante) et 0,2 μN en sites d'enzyme. Chaque constante de vitesse (k_{cat}) représente une moyenne d'au moins 4 déterminations indépendantes. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde (voir section *Materials and methods* de la publication 1, page 58) et les constantes déterminées sont : $\text{p}K_{\text{app}} = 8,6 \pm 0,2$ et $k_{\text{cat}} = 21 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$. L'erreur standard sur chaque valeur expérimentale est inférieure à 5 %.

1.4.3. Mutant F465G

La substitution F465G entraîne une modification de la nature de l'étape limitante de la réaction qui devient associée à l'étape d'acylation. Le k_{ac} est diminué d'un facteur 10^5 par

rapport au type sauvage alors que le K_M du (D,L)-G3P est diminué d'un facteur 2,5 (Tableau 1). Par contre, le K_M du NADP est augmenté d'un facteur 20. La valeur de k_{ac} ($8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) étant trop faible pour mesurer des variations significatives de cette vitesse en fonction du pH, il n'a pas été possible de déterminer la valeur des pK_{app} des groupements ionisables impliqués dans l'étape d'acylation.

2. Caractérisation préliminaire des propriétés de coopérativité de la GAPN de *S. mutans*

2.1. Mise en évidence de l'existence de deux populations de sites actifs au sein du tétramère

Les résultats obtenus sur GAPN de *S. mutans* de type sauvage lors de l'étude de l'étape d'acylation en cinétique rapide, montrent que l'amplitude du saut de production de NADPH ne dépasse pas, dans la plupart des cas, 40 % de l'amplitude théorique attendue. Ceci suggère donc l'existence de deux populations de sites non équivalents au sein du tétramère. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer un tel résultat : soit seule la moitié des sites de l'enzyme est fonctionnelle, soit la vitesse associée à l'étape d'acylation pour deux des quatre sites est trop rapide pour que le saut de production de NADPH puisse être observé. Les expériences de titration de sites réalisées sur le mutant E268A (pour lequel l'étape de désacylation est très fortement ralentie) en utilisant un spectrophotomètre classique à double faisceau montrent un saut de production équivalent à celui attendu pour quatre sites fonctionnels par tétramère (résultat non montré). Sachant que le résidu E268 n'est pas essentiel à l'étape d'acylation, il est raisonnable d'extrapoler ce résultat au type sauvage. Par conséquent, la constante de vitesse associée à l'acylation pour deux des quatre sites doit être trop rapide pour que cette étape puisse être étudiée par cinétique rapide dans des conditions expérimentales classiques. Pour atteindre cette vitesse, deux approches expérimentales ont été retenues. La première a consisté à baisser la température à 5°C pour réaliser les tests en cinétique rapide, mais cela n'a pas conduit à une augmentation de l'amplitude observée à 340 nm. La seconde approche a consisté à réaliser des mesures en utilisant des concentrations sous-saturantes en substrat (D,L)-G3P dans le but de ralentir fortement la vitesse associée à l'étape d'acylation et ainsi d'observer une amplitude supérieure à 50 % du saut attendu. Cela ne s'est pas avéré concluant. Il n'a donc pas été possible d'accéder aux paramètres cinétiques caractérisant les deux sites les plus "rapides" par ces deux approches. Ceci signifie également que le k_{ac} associé à l'étape d'acylation est largement supérieur à 2500 s^{-1} pour ces deux sites (valeur déduite à partir de la valeur du temps mort de l'appareil dans les conditions expérimentales utilisées) alors qu'elle est d'environ 800 s^{-1} pour les deux autres sites.

Par contre, nous avons vu précédemment que dans le mutant F465Y, les quatre sous-unités sont équivalentes avec une vitesse associée à l'étape d'acylation d'environ 120 s^{-1} (voir résultats page XX). Ce résultat montre que la substitution F465Y conduit à une perte des

propriétés de coopérativité mais également à une diminution de la valeur du k_{ac} au minimum d'un facteur 20 pour les deux sites non titrés et d'un facteur 7 pour les deux sites titrés (voir partie Discussion-Perspectives, p12).

2.2. Rôle de la boucle 453-467

L'examen des alignements de séquences de l'ensemble des ALDH et des structures cristallines disponibles indique que le résidu F465 invariant est retrouvé dans la longue boucle N453-G467 localisée à l'interface monomère/monomère d'un même dimère (Figure 26). Cette boucle pourrait jouer un rôle essentiel dans la transmission du signal de coopérativité entre deux monomères adjacents. Il est donc possible que la substitution F465Y ait entraîné une modification de la conformation de cette boucle, même mineure, rendant les quatre sous-unités équivalentes.

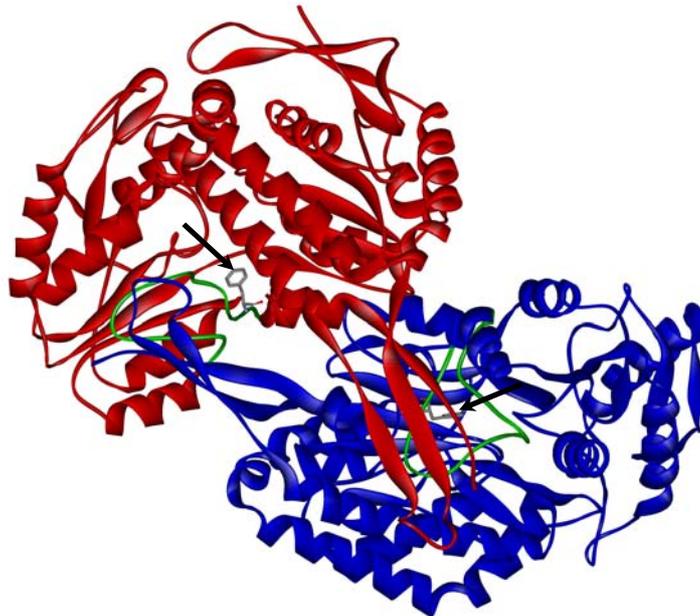


Figure 26 : Représentation schématique de l'interface inter-monomère au sein d'un même dimère de la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi *et al.*, 2000). La boucle 445-467, représentée en vert, est localisée à proximité du domaine d'oligomérisation du monomère adjacent au sein d'un même dimère. La position du résidu F465 est indiquée par une flèche noire.

L'analyse de l'alignement des séquences de cette région indique que cette boucle porte une signature particulière **R₄₅₉GXD_XF₄₆₃P₄₆₄F₄₆₅** qui est retrouvée dans toutes les GAPN, X représentant un résidu quelconque.

	453	467
GAPN <i>S. mutans</i>	INNKTQRGTDNF	PF LG
Consensus GAPN	IN RG D	PF G
Consensus ALDH	N	PF GG
Consensus MSDH	N PIPVP	SF G

Figure 27 : Alignement partiel de structure primaire de GAPN de *S. mutans* avec les consensus GAPN, MSDH (enzyme représentative des ALDH CoA dépendantes) et ALDH non CoA dépendantes. 19 séquences de GAPN, 7 séquences de MSDH et 40 séquences d'ALDH (à l'exception de GAPN et MSDH) issues de banques de données EMBL, Swiss-Prot, GenBank™, et Pir ont été alignées pour déterminer trois consensus représentatifs. La signature P₄₆₄F₄₆₅ est indiquée en rouge alors que la signature identifiée chez les MSDH est indiquée en bleu. Il est à noter que la boucle est décalée dans la MSDH de *B.subtilis* (correspond aux résidus 445-467).

Le fait de retrouver un résidu proline invariant (dans les GAPN) en position -1 par rapport à F465 n'est sans doute pas fortuit car cette proline doit imposer des contraintes géométriques strictes au niveau de la boucle 453-467. Dans l'hypothèse où la disparition des propriétés de coopérativité observées avec le mutant F465Y serait la conséquence d'une modification de la conformation de cette boucle, la substitution du résidu P464 pouvant permettre de confirmer l'importance de la conformation de cette boucle dans l'expression des propriétés de coopérativité.

La substitution du résidu P464 en alanine conduit à des effets drastiques au niveau cinétique mais également au niveau structural. En effet, la vitesse globale de la réaction est diminuée d'un facteur 1300 par rapport au type sauvage juste après le dessalage de la solution protéique stock (l'enzyme étant conservée à une température de -20°C en présence de 90% de sulfate d'ammonium). Par contre, moins d'une heure après ce dessalage, l'activité spécifique de ce mutant est encore diminuée d'un facteur 10 supplémentaire. Aucune caractérisation de ses propriétés enzymatiques n'a donc pu être entreprise.

Une hypothèse envisageable pour expliquer cette chute brutale de l'activité spécifique de l'enzyme après dessalage était que la structure quaternaire de la protéine subissait une modification puisque la substitution a été introduite dans la boucle située à l'interface de deux monomères. Afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse, l'état oligomérique de la protéine a été vérifié à l'aide d'une colonne analytique de filtration sur gel couplée à un système HPLC. Les résultats obtenus montrent toujours un état tétramérique indiquant que la perte d'activité n'est pas due à une modification de l'état oligomérique de la protéine. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions natives.

Le mutant P464V, qui a également été généré, présente des propriétés comparables à celles décrites pour le mutant P464A, donc aucun paramètre catalytique n'a pu à nouveau être déterminé. Bien que très préliminaires, ces résultats montrent cependant que le résidu P464 est essentiel au maintien d'une forme catalytiquement compétente de la GAPN de *S. mutans*.

Discussion-Perspectives

Un des trois objectifs de mon projet de thèse concernait deux aspects du mécanisme catalytique des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, à savoir le mode de stabilisation de la partie nicotinamide du cofacteur permettant un transfert d'hydrure efficace dans l'étape d'acylation et la nature du changement conformationnel que doit subir le cofacteur entre les étapes d'acylation et de désacylation en vue de permettre au résidu E268 de jouer son rôle de catalyseur dans l'hydrolyse de l'intermédiaire thioacylenzyme.

Au niveau de l'étape d'acylation, nos résultats sont en faveur d'un rôle majeur du résidu T244 dont le positionnement est assuré par la liaison hydrogène K178/T244. Son groupement β -CH₃ permet au noyau nicotinamide d'adopter une conformation adaptée par rapport à l'intermédiaire hémithioacétal en vue d'un transfert d'hydrure efficace. Le fait que ce résidu soit invariant dans les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, permet-il d'étendre nos conclusions à l'ensemble des ALDH de cette famille ? Les résultats obtenus de façon concomitante par l'équipe de H. Weiner sur l'ALDH1 humaine permettent d'affiner nos interprétations (Ho *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que la substitution T244S conduit à des effets cinétiques différents de ceux que nous avons observés sur la GAPN de *S. mutans*. Dans le cas de l'ALDH1, l'étape de désacylation reste limitante. Cependant, l'étape limitante n'est plus associée à la libération du cofacteur réduit mais à l'étape d'hydrolyse. Dans le cas de la GAPN, cette substitution conduit à des effets plus drastiques avec une étape limitante qui devient associée à l'étape d'acylation dont la vitesse est diminuée d'un facteur 2900 par rapport au type sauvage (l'étape cinétiquement limitante restant associée au transfert d'hydrure). Une comparaison pertinente de nos résultats avec ceux obtenus sur l'ALDH1 est difficile dans la mesure où aucune étude à l'état pré-stationnaire n'a été entreprise sur le mutant T244S de l'ALDH1. Il est possible, en particulier, que cette substitution conduise également à une diminution de la vitesse associée à l'étape d'acylation. Le fait que le K_D pour le NAD soit diminué d'un facteur 270 par rapport au type sauvage indique que la substitution T244S affecte de façon significative la liaison du cofacteur. Ce résultat combiné à l'examen de la structure tridimensionnelle du complexe binaire cristallin ALDH1/NAD a conduit Weiner *et coll.* à formuler une proposition similaire à la nôtre pour le rôle du groupement β -CH₃ du résidu T244 dans l'étape d'acylation. Comment expliquer alors les résultats cinétiques, en apparence contradictoires, obtenus pour la GAPN et l'ALDH1 ? Pour le mutant T244S de l'ALDH1, l'absence d'un effet cinétique plus drastique au niveau de l'étape d'acylation pourrait être expliqué par l'influence des ions Mg²⁺ sur la conformation de la partie NMN du NAD. En effet, des études structurales ont montré que les ions Mg²⁺ augmentent la stabilité du complexe binaire ALDH1/NAD, en interagissant avec le

groupement pyrophosphate du cofacteur, et favorise une conformation de la partie NMN du NAD compatible avec un transfert efficace de l'hydrure (Hammen *et al.*, 2002). Ce résultat représente une différence fondamentale avec la GAPN de *S. mutans* dans la mesure où aucun rôle de ce type ne peut être assigné aux ions Mg^{2+} (ou à d'autres cations métalliques), leur présence n'ayant d'ailleurs jamais été mise en évidence dans les différentes structures cristallines disponibles.

Dans un cadre plus général, l'ensemble des résultats obtenus sur la GAPN et l'ALDH1 montre que le rôle du groupement β - CH_3 du résidu T244 dans l'étape d'acylation semble être commun à l'ensemble de la famille des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes. L'importance de sa contribution est sans doute modulée par la présence d'ions Mg^{2+} dans certaines classes d'ALDH, comme les ALDH1 voire les ALDH2. L'évolution a donc conduit à différentes solutions pour permettre un positionnement adéquat de la partie nicotinamide du cofacteur au sein du complexe ternaire hémithioacétal/NAD(P). Ces conclusions peuvent-elles être étendues à l'autre famille d'ALDH non phosphorylantes, à savoir celles qui sont CoA dépendantes ? L'examen de la structure d'un complexe binaire cristallin MSDH de *B. subtilis*/NAD, obtenue récemment en collaboration avec le groupe de Biocristallographie de Nancy, révèle un mode de stabilisation différent de la partie nicotinamide (H. Dubourg, 2006). En particulier, sa conformation est stabilisée par l'établissement de plusieurs liaisons hydrogène directes ou indirectes entre sa fonction carboxamide et plusieurs résidus du site de fixation du cofacteur. Il est cependant intéressant de noter que le résidu valine présent en position 244 est retrouvé à une distance du noyau nicotinamide compatible avec l'existence d'interactions de Van der Waals. Ainsi, il semble que l'interaction du groupement méthyle du résidu 244 (le β - CH_3 de la T244 et l'un des deux méthyles de la V244) avec le noyau du nicotinamide soit une caractéristique commune à l'ensemble de la famille des ALDH non phosphorylantes, mais avec une contribution sans doute moins importante pour celles qui sont CoA dépendantes.

Notre travail de collaboration avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy a également conduit à l'obtention d'un complexe covalent thioacylenzyme/NADPH de la GAPN de *S. mutans*, le premier pour l'ensemble de la superfamille des ALDH. L'analyse de la structure cristalline de ce complexe a permis de mettre en évidence l'isomérisation de la partie NMNH du cofacteur après le transfert d'hydrure. Cette isomérisation s'avère indispensable pour que le résidu E268 puisse jouer son rôle lors de l'étape d'hydrolyse. De plus, cette observation est en accord avec le mécanisme cinétique de type séquentiel ordonné

décrit pour les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, dans lequel le cofacteur réduit se dissocie après la libération du produit. Le basculement de la portion NMNH du cofacteur est rendu possible par l'existence d'une large cavité, retrouvée dans l'ensemble des structures cristallines de cette famille d'ALDH et composée en partie de résidus conservés. Il est donc raisonnable de postuler que l'isomérisation du cofacteur fait partie intégrante du mécanisme catalytique de ces ALDH. Se pose alors la question de la nature des facteurs moléculaires et structuraux qui permettent ce basculement. Il est évident que le mode de liaison particulier du cofacteur rencontré dans cette famille d'ALDH, notamment la faible stabilisation du pyrophosphate et de la partie NMN du cofacteur, est un facteur qui rend possible ce basculement mais il ne l'explique pas. Dans la partie Discussion de l'article 2 page 92, nous avons émis un certain nombre d'hypothèses relatives à la nature des forces motrices favorisant ce basculement à savoir : la perte de l'interaction potentielle entre la charge négative de l'oxyanion de l'intermédiaire hémithioacétal et la charge positive du noyau nicotinamide du NADP suite au transfert d'hydrure, et la non planéité du noyau dihydropyridine du NADPH. L'examen de la structure cristalline du mutant C302R de la GAPN de *S. mutans* obtenue en présence de NADP s'est avéré informatif car il montre que la barrière énergétique existant entre les deux conformations majoritaires adoptées par le cofacteur au cours du cycle catalytique est sans doute faible. En effet, la chaîne latérale du résidu R302 mime relativement bien l'intermédiaire covalent thioacylenzyme alors que la partie NMN du cofacteur oxydé est retrouvée dans la poche occupée par la portion NMNH du NADPH dans la structure cristalline de l'intermédiaire thioacylenzyme. De plus, ce résultat est compatible avec l'hypothèse de l'interaction oxyanion/nicotinamidium.

Il serait maintenant intéressant de caractériser cette isomérisation du cofacteur d'un point de vue cinétique. Pour aborder cette problématique, la stratégie retenue va consister à substituer le résidu F168 localisé dans la cavité constituant le site de liaison de la partie NMNH du NADPH par un résidu tryptophane (figure 28), la substitution F168W permettant d'utiliser la technique de transfert résonnant d'énergie de fluorescence (FRET). Le principe de cette approche repose sur l'excitation spécifique des résidus tryptophanes de la GAPN à 295 nm, et le suivi de l'évolution du spectre d'émission de fluorescence au cours de la réaction. La GAPN de *S. mutans* possède trois résidus tryptophanes localisés soit dans le domaine de fixation du cofacteur (W28 et W76), soit dans le domaine catalytique (W397) (Marchal *et al.*, 2001). A titre de contrôle, le suivi de la réaction en cinétique rapide nous a déjà permis de vérifier qu'aucun phénomène de FRET ne se produit dans la GAPN de type sauvage. Après le transfert d'hydrure, le basculement du noyau dihydropyridine du NADPH dans cette cavité va

le positionner à proximité du résidu W168. Ce positionnement relatif des deux fluorophores devrait conduire à un phénomène de FRET spécifique du couple W168/NMNH se traduisant par l'apparition d'un signal de fluorescence vers 450 nm. Dans ce cas, le résidu W168 jouerait le rôle de donneur et le noyau dihydropyridine celui d'accepteur. Ainsi, il devrait pouvoir être possible d'accéder à la constante de vitesse associée à l'isomérisation du cofacteur réduit mais également à celle associée à sa dissociation après la libération du produit. Cette approche FRET est en cours de validation par R. Bchini dans le cadre de son projet de M2R (coencadrements F. Talfournier et S. Rahuel-Clermont).

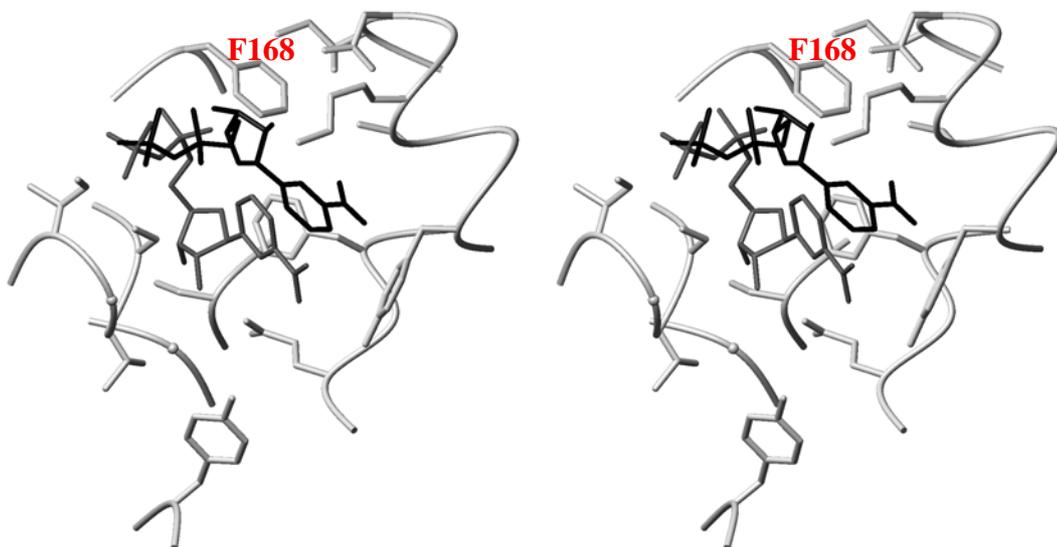


Figure 28 : Vue stéréo de la cavité constituant le site de liaison de la partie NMNH du cofacteur dans la structure cristalline du complexe covalent thioacylenzyme/NADPH de la GAPN de *S. mutans* (D'Ambrosio *et al.*, 2006). Les deux conformations conf A et conf B sont représentées dans la cavité alors que seule la position du résidu F168 est indiquée en rouge.

Ce mécanisme d'isomérisation du cofacteur au cours de la catalyse est spécifique des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes. En effet, un tel basculement de la partie NMNH du cofacteur n'est pas nécessaire dans les ALDH non phosphorylantes CoA dépendantes et la GAPDH, membre représentatif de la famille des ALDH phosphorylantes, car pour ces deux familles d'ALDH le mécanisme cinétique est de type ping-pong (Shone et Fromm, 1981 ; Söhling et Gottschalk, 1993 ; Stines-Chaumeil *et al.*, 2006 ; Harris et Waters, 1976). Le cofacteur réduit se dissocie donc de l'enzyme après le transfert d'hydrure. Dans le cadre des ALDH non phosphorylantes, ceci pose une question intéressante en terme d'évolution. Elle concerne la nature des facteurs structuraux et/ou moléculaires responsables du départ "précoce" du cofacteur réduit dans les ALDH CoA dépendantes et de ceux qui ne le

permettent pas dans les ALDH non CoA dépendantes. Dans le cas des ALDH CoA dépendantes, une des hypothèses est que les sites de fixation du CoA et du cofacteur NAD se superposent au moins partiellement. Le départ du NADH serait alors un préalable à la liaison du CoA. Une alternative serait l'absence de la cavité décrite pour les ALDH non CoA dépendantes rendant impossible l'isomérisation du cofacteur réduit. L'examen de la structure cristalline du complexe binaire de la MSDH de *B. subtilis* obtenu en présence de NAD et, très récemment, celle d'un complexe ternaire MSDH/NAD/CoA permet d'écarter ces deux hypothèses (H. Dubourg, 2006). Cependant, l'analyse approfondie du site de fixation de l'adénine du NAD(P) de la MSDH et des ALDH non CoA dépendantes a permis d'apporter des éléments de réponse (H. Dubourg, 2006). L'analyse des facteurs d'agitation thermique (B) a révélé que la MSDH est la seule ALDH pour laquelle le cycle adénine présente un facteur B supérieur à celui du nicotinamide (44 contre 40) et surtout nettement supérieur au facteur B de l'ensemble des atomes de la protéine (30). La superposition des structures cristallines des formes holo des ALDH avec celle de la MSDH montre que cette dernière est l'ALDH dans laquelle le cycle adénine est le plus exposé au solvant. L'analyse de la poche de fixation de l'adénine permet de mettre en évidence certains facteurs structuraux susceptibles d'expliquer les différences observées entre les mécanismes cinétiques des ALDH CoA dépendantes ou non. Le cycle adénine s'insère entre les extrémités N-terminales des hélices α_D et α_E et se pose sur les brins β_A , β_B et β_D , sa stabilisation étant essentiellement assurée par des contacts de Van der Waals, comme décrit pour les ALDH non CoA dépendantes. La différence la plus importante au niveau de cette poche de liaison concerne la position 228 occupée par un résidu valine dans la MSDH, qui est remplacé par un résidu glycine dans les ALDH non CoA dépendantes dont la GAPN. Le résidu V228 réduit la profondeur de la poche de fixation du cycle adénine et en conséquence affaiblit les contacts de Van der Waals. La seconde différence concerne l'existence d'une délétion au niveau N-terminal de l'hélice α_D dans la MSDH correspondant à la position 224 (figure 29).

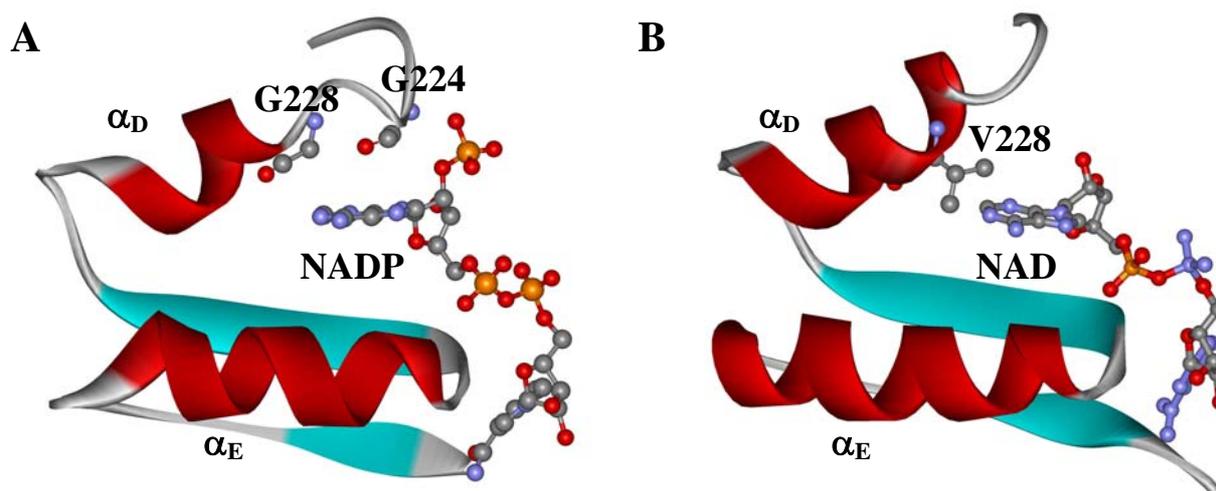


Figure 29 : Représentation schématique de la poche de liaison du cycle adénine dans A) la GAPN de *S. mutans* et B) la MSDH de *B. subtilis* (figures réalisées d'après Cobessi *et al.*, 1999 et H. Dubourg, communication personnelle). Pour plus de clarté, seuls certains éléments de structures secondaires constituant la poche de liaison du cycle adénine ont été représentés. Les positions 224 et 228 sont également indiquées.

L'évolution aurait donc conduit à l'existence de deux modes de liaisons du cofacteur au sein des ALDH non phosphorylantes en dépit d'une topologie de repliement et d'une réaction catalysée similaires. Cette hypothèse séduisante mérite d'être validée. C'est dans ce cadre que plusieurs mutants ont déjà été générés pour la GAPN de *S. mutans* et la MSDH de *B. subtilis*. L'approche a consisté pour GAPN à substituer le résidu G228 par une valine et à réaliser la délétion du résidu G224, et pour la MSDH à substituer le résidu V228 par une glycine et à réaliser l'insertion (notée ::G224) d'un résidu glycine à une position équivalente à celle occupée par le résidu G224 dans la GAPN. Les mutants G228V/ Δ 224 de GAPN et V228G:: Δ 224 de la MSDH ont été obtenus. La mutation ponctuelle de chacune de ces positions va également être entreprise. La caractérisation des propriétés enzymatiques de l'ensemble de ces mutants représente également un aspect du projet de recherche de R. Bchini dans le cadre de son stage de M2R. En fonction des résultats cinétiques obtenus, il serait ensuite intéressant de caractériser ces mutants d'un point de vue structural.

Le second objectif de mon projet de thèse concernait la caractérisation de l'environnement protéique du résidu E268 dans la GAPN de *S. mutans* et de son influence sur le positionnement et/ou l'activation de ce résidu. L'examen de la structure "Apo 2", considérée comme représentative de la forme biologiquement active, avait révélé la présence d'un environnement composé des résidus L174, T244, L427 et F465 très conservés voire invariants dans la famille des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes. Le caractère

essentiellement hydrophobe des chaînes latérales de ces résidus pouvait être responsable du pK_{app} anormalement élevé du résidu E268 (7,6) mais également être impliqué dans le positionnement de ce résidu en limitant la liberté conformationnelle de sa chaîne latérale (Figure 30). Dans le but de valider ou non ces hypothèses, différents mutants ont été générés et leurs propriétés cinétiques caractérisées.

La substitution L174A se révèle drastique car elle conduit à un changement d'étape limitante qui devient associée à l'acylation avec une constante de vitesse k_{ac} diminuée d'un facteur 320 par rapport au type sauvage. Ceci s'accompagne également d'une modification de la nature de l'étape limitante au sein de l'étape d'acylation qui n'est plus associée au transfert d'hydrure mais qui le précède. L'inspection de la structure cristalline de la forme Apo 2 indique que les deux groupements δ -CH₃ de la chaîne latérale du résidu L174 seraient situés à environ 4-4,5 Å de l'atome de carbone du groupement guanidinium de la chaîne latérale du résidu R459 (avec les réserves émises précédemment du fait de la flexibilité conformationnelle de cette chaîne latérale) (Figure 30).

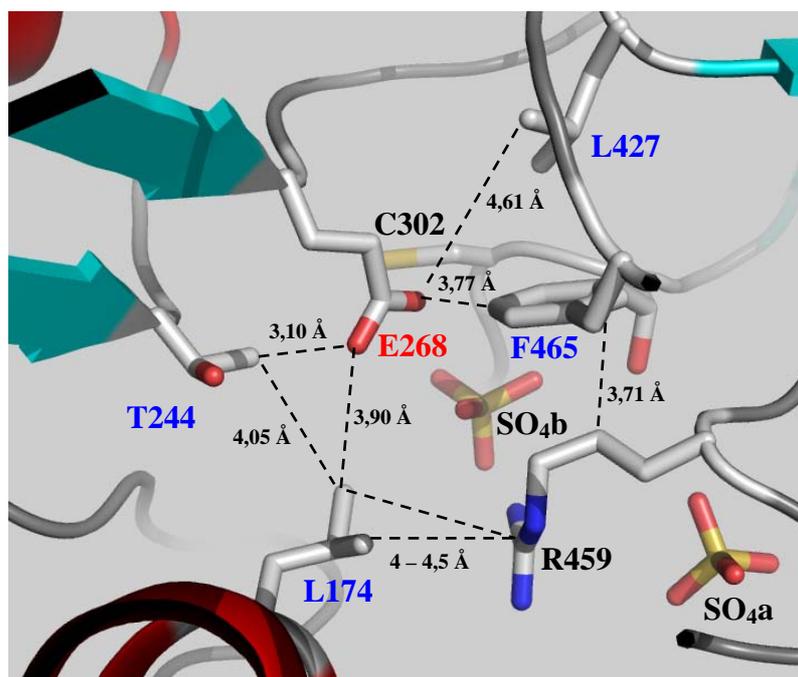


Figure 30 : Représentation schématique de l'environnement protéique autour du résidu E268 dans la structure cristalline de la forme Apo2 de la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi *et al.*, 2000).

Les résidus L427, R459, F465 sont localisés dans des boucles et les résidus T244 et E268 à l'extrémité C-terminale d'un brin β , le résidu L174 est retrouvé dans une hélice α , alors que la C302 catalytique est retrouvée au niveau d'un coude β . Les distances sont mentionnées à titre indicatif.

Il est donc envisageable que la substitution L174A entraîne une flexibilité conformationnelle accrue de la chaîne latérale de R459. Si tel est le cas, ce résidu pourrait ne plus être positionné de manière adéquate pour permettre la formation d'un complexe ternaire efficace. Ainsi une des conséquences de cette substitution serait un positionnement relatif non optimal de la fonction thiolate de la C302 catalytique et de la fonction aldéhyde du substrat. L'ensemble des résultats obtenus pour le mutant L174A semble valider cette hypothèse. Celle-ci pourrait également expliquer, au moins partiellement, l'augmentation d'une unité du pK_{app} de la C302 par rapport au type sauvage au cours de l'étape d'acylation. Une alternative consiste à envisager une réorientation de sa chaîne latérale due à un mouvement de la partie NMN du cofacteur. L'examen de la structure tridimensionnelle de la forme "Apo 2" indique en effet que la distance entre les groupements β -CH₃ de la T244 et δ -CH₃ de la L174 est d'environ 4 Å. La substitution L174A conduirait alors à une modification du positionnement de la chaîne latérale de la T244 entraînant un mouvement de la portion NMN du NADP. Ce mouvement amènerait à une réorganisation conformationnelle de la chaîne latérale de la C302. Cependant, cette hypothèse peut raisonnablement être écartée car nous avons montré que la conformation de la chaîne latérale du résidu T244 est stabilisée par la liaison hydrogène K178/T244. La substitution L174A ne devrait donc pas engendrer de modifications significatives de l'orientation de sa chaîne latérale, mais ceci n'exclut pas une contribution même mineure de l'interaction potentielle L174/T244. De même, cela aurait dû avoir pour conséquence une étape cinétiquement déterminante associée au transfert d'hydrure au sein de l'étape d'acylation. Or nos résultats cinétiques montrent que cela n'est pas le cas. Le profil de la variation de k_{ac} en fonction du pH montre également que le résidu E268, dont le pK_{app} est de 7,6 dans le type sauvage, n'est plus titrable. Dans le type sauvage, le résidu E268 ne joue pas un rôle essentiel dans l'étape d'acylation mais il permet d'augmenter la caractère nucléophile de la fonction thiolate de la C302. Le résultat obtenu avec le mutant L174A traduit une orientation relative de la fonction carboxylate de E268 et de la fonction thiolate de la C302 différente de celle présente dans le type sauvage. Il est vraisemblable qu'elle soit la conséquence d'un mouvement de la chaîne latérale de la C302 (voir argument avancé précédemment) mais également d'une réorganisation conformationnelle de la chaîne latérale de E268. Cette hypothèse est confortée par le fait que la substitution L174A peut entraîner une flexibilité accrue de cette chaîne latérale due à la diminution de l'encombrement stérique (voir Figure 30).

Comme mentionné dans la publication 1, la substitution T244S engendre des effets drastiques en termes de propriétés catalytiques. Le profil de la variation de k_{ac} en fonction du

pH montre également que le résidu E268 n'est plus titrable. L'examen de la structure cristalline de la forme "Apo 2" montre que le groupement β -CH₃ de la T244 serait localisé à environ 3,5 Å du groupement carboxylate de E268. L'absence du groupement β -CH₃ suite à la substitution T244S diminuerait l'encombrement stérique autour du γ -COO⁻ et conduirait à une flexibilité conformationnelle plus importante de la chaîne latérale de E268. Il en résulterait alors une modification de son environnement protéique expliquant la modification de son pK_{app} . L'introduction d'un résidu polaire comme la sérine devrait contribuer à diminuer le caractère hydrophobe de l'environnement protéique autour du groupement carboxylate de E268 et donc à favoriser la diminution de son pK_{app} . Dans ce cas, il est possible qu'une valeur proche de 6,8 (valeur déterminée pour le pK_{app} de la C302) pour le pK_{app} de E268 ne permette pas de distinguer les deux contributions lors de l'ajustement des données. Une alternative consiste à envisager une modification du positionnement relatif de la chaîne latérale de E268 par rapport à la C302 qui se traduirait par la non implication du résidu E268 dans l'étape d'acylation. L'existence d'une telle interaction T244/E268 suggère également qu'elle puisse jouer un rôle dans le positionnement du résidu E268 au niveau de l'étape de désacylation. Pour le mutant T244S de la GAPN de *S. mutans*, cette contribution éventuelle ne peut pas être caractérisée car l'étape d'acylation est limitante. Les résultats obtenus par l'équipe de H. Weiner sur l'ALDH1 humaine sont effectivement en faveur d'un rôle du résidu T244 dans l'étape de désacylation (Ho *et al.*, 2006). La présence du groupement β -CH₃ de la T244 permettrait au résidu E268 d'adopter une conformation compatible avec son rôle dans l'activation et le positionnement de la molécule d'eau impliquée dans l'étape d'hydrolyse. Ce rôle du résidu T244 dans l'étape de désacylation est d'ailleurs conforté par le caractère invariant du résidu T244 dans les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes alors qu'il est systématiquement remplacé par un résidu valine dans les ALDH CoA dépendantes comme la MSDH, dans lesquelles le résidu E268 est absent.

La substitution L427G se révèle moins drastique dans la mesure où l'étape limitante de la réaction reste associée à la désacylation. Par contre, l'analyse des profils $k_{ac} = f(\text{pH})$ et $k_{cat} = f(\text{pH})$ montre que le résidu E268 n'est pas titrable tant au niveau de l'étape d'acylation que de l'étape de désacylation. Le fait que la valeur de k_{ac} soit proche de celle déterminée pour le mutant E268A suggère que dans le mutant L427G, le résidu E268 ne joue plus aucun rôle dans l'étape d'acylation. Ceci reflète sans doute une modification de la conformation de sa chaîne latérale, affectant également l'étape de désacylation comme l'indique la diminution d'un facteur 60 du k_{cat} . Le mouvement de la chaîne latérale de E268 est vraisemblablement

permis par l'absence d'une chaîne latérale en position 427 et doit être relativement subtile car les conséquences au niveau cinétique sont beaucoup moins importantes que pour les mutants L174A et T244S. Il est donc raisonnable de proposer que la contribution du résidu L427 au positionnement de E268 soit mineure.

En ce qui concerne la position 465, les résultats obtenus pour le mutant F465Y montrent que l'introduction d'un résidu tyrosine ne modifie pas la nature de l'étape limitante de la réaction qui reste associée à la désacylation. Le profil $k_{ac} = f(\text{pH})$ révèle la contribution des résidus C302 et E268 dont les valeurs de $\text{p}K_{app}$ sont respectivement augmentées de 0,5 et 0,3 unité par rapport au type sauvage. Le caractère polaire du résidu Y465 ne conduit pas à une modification sensible de l'orientation de la chaîne latérale de E268 au sein de l'étape d'acylation. Par contre, l'augmentation du $\text{p}K_{app}$ du résidu E268 de 0,3 unité montre qu'il est situé dans un environnement plus hydrophobe. Un tel résultat n'était pas attendu, suggérant que la substitution F465Y doit engendrer des perturbations structurales beaucoup plus complexes qui se traduisent d'ailleurs par une étape cinétiquement déterminante associée à l'attaque nucléophile de la C302 et à la perte des propriétés de coopérativité observées sur le type sauvage (ce point sera développé plus loin). Au niveau de l'étape de désacylation, notre approche cinétique n'a pas permis de titrer le résidu E268. Ce résultat n'est pas nécessairement en contradiction avec celui obtenu pour l'acylation car ce résidu ne joue pas le même rôle dans les deux étapes du mécanisme. Nous devons cependant rester prudents dans l'interprétation du profil $k_{cat} = f(\text{pH})$ car les conditions expérimentales nécessaires à l'obtention de ce profil conduisent à une diminution du k_{cat} d'un facteur 12 par rapport aux conditions classiques de tests d'activité. Dans l'hypothèse où sa validité n'est pas remise en cause, l'introduction du résidu tyrosine provoque une réorientation de la chaîne latérale du résidu E268 qui conduit à une activation et un positionnement moins efficace de la molécule d'eau impliquée dans l'étape d'hydrolyse, comme le montre la diminution d'un facteur 15 du k_{cat} .

Contrairement aux études menées sur les autres mutants qui s'intégraient dans la problématique plus générale de la caractérisation de l'environnement protéique du résidu E268 dans les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, l'étude des propriétés enzymatiques des mutants F465L et F465G avait pour but d'évaluer l'importance de l'interaction potentielle F465/R459 dans le mécanisme catalytique de GAPN. Les résultats obtenus sont compatibles avec un rôle de cette interaction dans le positionnement de la chaîne latérale du résidu R459 mais en l'état actuel des résultats l'importance de sa contribution reste difficile à évaluer. En effet, chacune de ses substitutions doit conduire à des perturbations

structurales supplémentaires qui rendent toute interprétation spéculative. L'analyse du profil $k_{\text{cat}} = f(\text{pH})$ pour le mutant F465L révèle la contribution d'un seul groupement ionisable de $\text{p}K_{\text{app}} 8,6$. Sur la base des interprétations avancées pour le type sauvage, ce $\text{p}K_{\text{app}}$ devrait correspondre à celui de la C302 et serait donc augmenté de 2,4 unités par rapport au type sauvage. Un tel résultat reste à expliquer. Le résidu 465 étant localisé dans une longue boucle retrouvée à l'interface inter-monomère au sein d'un même dimère, il est raisonnable de penser que l'introduction d'une chaîne latérale plus flexible que le noyau phényle de la F465, comme c'est le cas pour le mutant F465L et a fortiori pour le mutant F465G, entraîne des perturbations structurales qui ne sont plus restreintes à l'environnement du résidu E268 mais qui déstabilisent l'architecture du site actif.

En conclusion de ce volet de mon projet de thèse relatif à la caractérisation de l'environnement protéique du résidu E268, il apparaît que les résultats obtenus sont pour la plupart qualitatifs, notre approche cinétique ne nous ayant pas permis de titrer le résidu E268 (sauf exception). Dans le cas des mutants pour lesquels l'étape limitante de la réaction restait associée à l'étape de désacylation, l'approche la plus évidente pour titrer le résidu E268 consistait à réaliser des mesures d'effets isotopiques de solvant $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (à condition que l'étape cinétiquement déterminante reste associée à l'activation de la molécule d'eau). Malheureusement, nous n'avons jamais été capables de reproduire les résultats obtenus sur le type sauvage (Marchal *et al.*, 2000). La seule interprétation qui puisse a priori être avancée est liée à la modification de la composition des milieux de culture (due à la législation relative à l'utilisation d'extraits biologiques d'origine bovine) depuis la fin de la thèse de S. Marchal. Celle-ci conduirait à la production d'une forme de GAPN dont certaines propriétés seraient différentes de celles décrites précédemment. Les résultats obtenus par spectroscopie d'absorption atomique sont compatibles avec cette hypothèse. En effet, il avait été montré que la GAPN de *S. mutans* contenait deux ions Ca^{2+} par tétramère sans qu'aucun rôle n'ait jamais pu leur être assigné. Seul l'effet inhibiteur d'agent chélatant comme l'EDTA avait été mis en évidence sans toutefois pouvoir être interprété car l'examen des différentes structures cristallines de GAPN n'avait pas jamais permis de localiser leur site de liaison. Les analyses réalisées depuis le début de ma thèse montre une stoechiométrie $\text{Ca}^{2+}/\text{GAPN}$ de l'ordre de 1. Il semblerait donc que le contenu en ions Ca^{2+} module en partie les propriétés catalytiques de la GAPN de *S. mutans*. Une alternative aux mesures d'effets isotopiques de solvant consistait à utiliser une sonde chimique spécifique des groupements carboxylates comme le réactif K de Woodward (Llamas *et al.*, 1986) mais là encore les tests effectués ne se sont pas avérés concluants.

L'ensemble des résultats obtenus sur les mutants générés a également mis en évidence la flexibilité conformationnelle de la chaîne latérale du résidu E268. Celle-ci a d'ailleurs été décrite comme étant un des éléments clés du mécanisme catalytique des ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, à l'instar de la mobilité de la partie NMN du cofacteur (Moore *et al.*, 1998). La réorientation de la chaîne latérale de 268 due à la rupture du pont salin E268⁻/R459⁺ lors de la transition apo-holo est d'ailleurs considérée comme un préalable à l'obtention d'une forme catalytiquement compétente de la GAPN de *S. mutans*.

Enfin, le dernier objectif de mon projet de thèse était d'apporter une contribution à la compréhension des propriétés de coopérativité observées dans quelques ALDH, CoA dépendantes ou non. De telles propriétés se caractérisent au niveau cinétique par une réactivité de demi-site correspondant à deux sous-unités actives par tétramère (Zhou et Weiner, 2000 ; Hurley *et al.*, 2001 ; Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Cette réactivité de demi-site a été interprétée comme un exemple extrême de coopérativité négative. Les études réalisées sur l'ALDH2 de foie humain et son variant oriental (E487K, noté ALDH2*2) ont conduit Weiner *et coll.* à proposer un modèle dans lequel seule une sous-unité serait active par dimère (Zhou et Weiner, 2000). L'interface inter-monomère au sein de chaque dimère serait impliquée dans la transmission du message conduisant à la coopérativité. Ce modèle a également été retenu pour l'interprétation des propriétés de réactivité de demi-site observées dans notre équipe pour la MSDH de *B. subtilis* (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Dans la GAPN de *S. mutans*, nous avons aussi mis en évidence deux populations de sous-unités non équivalentes au sein du tétramère, la différence majeure par rapport aux deux autres exemples cités précédemment étant que les quatre sous-unités sont actives. Les propriétés du mutant F465Y de la GAPN de *S. mutans*, où les quatre sous-unités sont maintenant cinétiquement équivalentes, sont aussi en faveur d'une transmission du message de coopérativité à travers l'interface inter-monomère au sein d'un dimère. En effet, comme indiqué page 106 dans la partie Résultats, la position 465 est localisée dans une longue boucle de 15 résidus située à l'interface inter-monomère au sein de chaque dimère. La substitution F465Y doit certainement provoquer un changement conformationnel de cette boucle ne permettant plus d'assurer la transmission du signal de coopérativité entre les deux monomères d'un même dimère. Le fait que cette boucle 453-467 soit retrouvée dans toutes les structures cristallines d'ALDH non phosphorylantes suggère que l'expression des propriétés de coopérativité est liée à une conformation définie de cette boucle ou à une modification de sa conformation. L'analyse de l'alignement des séquences de cette région indique l'existence d'une signature

P₄₆₄F₄₆₅ pour les ALDH non CoA dépendantes, et P₄₅₅XP₄₅₇XP₄₅₉X₄F₄₆₅ dans les MSDH à l'exception de celle de *B. subtilis* dans laquelle le résidu P455 est remplacé par une glycine, le troisième résidu proline étant retrouvé en position 464 (figure 27 page 107). La présence de résidus proline dans cette boucle doit entraîner des contraintes géométriques importantes qui, probablement combinées à d'autres facteurs structuraux, vont fortement influencer sa conformation. Les résultats préliminaires obtenus pour les mutants P464A et P464V de la GAPN de *S. mutans* indiquent que la substitution du résidu P464 conduit à des perturbations structurales qui affectent fortement la stabilité de ces mutants. Une approche semblable avait été menée sur la MSDH de *B. subtilis* par C. Stines-Chaumeil dans le cadre de sa thèse. Les résultats préliminaires obtenus pour les mutants P457A et P464A de la MSDH se sont avérés prometteurs dans la mesure où les quatre sous-unités sont devenues fonctionnelles. Cependant, elles constituent deux populations non équivalentes caractérisées par des constantes de vitesse différentes au niveau de l'étape d'acylation. En l'absence de données concernant l'ampleur des perturbations structurales engendrées par ces mutations, il était impossible d'aller plus loin dans les interprétations. Cependant, ces résultats suggéraient fortement que la conformation de la boucle 453-467 était un facteur structural important pour l'expression des propriétés de coopérativité. Ceci a d'ailleurs été confirmé de façon concomitante à nos travaux par les études réalisées sur l'ALDH2 humaine (Larson *et al.*, 2005 voir introduction page 50 pour une description détaillée). La comparaison des structures cristallines de l'ALDH2 et de l'ALDH2*2 a en effet permis à ces auteurs de montrer que bien que cette boucle n'interagisse pas directement avec le cofacteur, la modification de sa conformation dans l'ALDH2*2 conduit à une série de mouvements de chaînes principales et latérales qui vont se propager jusqu'au site de fixation du cofacteur du monomère adjacent (figure 31). L'ensemble de ces réorganisations conformationnelles a pour conséquence l'apparition des propriétés de coopérativité observées dans le variant ALDH2*2.

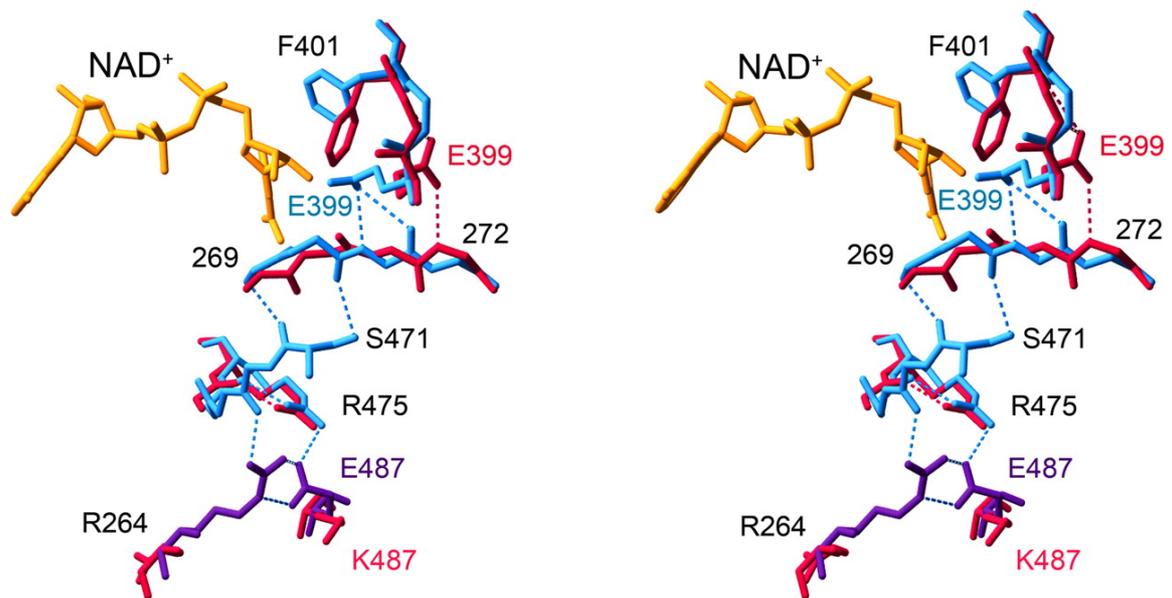


Figure 31 : Vue stéréo des mouvements de chaînes principales et latérales observés au niveau de l'interface du dimère et de leurs conséquences au niveau du site de liaison du NAD (Larson *et al.*, 2005). Les structures cristallines du complexe binaire ALDH2/NAD et de la forme apo de l'ALDH2*2 ont été superposées. Les monomères A et B de la forme holo du type sauvage sont respectivement représentés en violet et bleu, alors que ces monomères sont représentés en rouge pour le variant ALDH2*2. Sur cette figure seules sont représentées les perturbations structurales affectant le "sous-site" de liaison de la partie nicotinamide (pour une description plus détaillée voir partie introduction page 50)

Une approche structurale s'avère maintenant indispensable à la caractérisation plus approfondie des facteurs moléculaires et structuraux impliqués au niveau des interfaces dans les propriétés de coopérativité des ALDH non phosphorylantes. Dans ce contexte, la résolution des structures tridimensionnelles de complexes binaires tels que F465Y-GAPN/NADP, P464A-MSDH/NAD ou P457A-MSDH/NAD et leur comparaison à celles obtenues pour les complexes binaire de type sauvage devrait s'avérer informative.

Matériels et Méthodes

Cette partie "Matériels et Méthodes" est un complément de ce qui a été décrit dans les publications.

1. Matériel biologique

1.1. Plasmides

pDB125KS N/N : Plasmide recombinant pBluescript II KS⁺, obtenu par sous-clonage de la séquence codante et de la partie promotrice de *gapN*. Dans cette construction, l'orientation du gène *gapN* est identique à celle du promoteur du gène *lacZ* (Figure 32). De plus, le codon d'initiation de la traduction UUG du gène *gapN* a été remplacé, par mutagenèse dirigée, par un codon AUG.

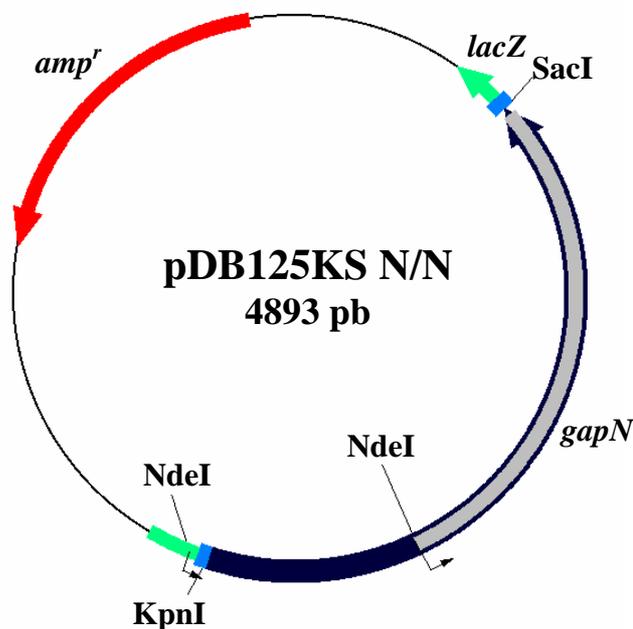


Figure 32: Carte de restriction simplifiée du vecteur d'expression, pDB125KS N/N.

Les gènes sont représentés par des flèches indiquant l'orientation des phases ouvertes de lecture. Dans cette construction, l'orientation du gène *gapN* est identique à celle du promoteur du gène *lacZ*.

1.2. Souches bactériennes utilisées

E. coli **DH5 α** : *supE44*, Δ *lacU169*, (Φ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique mais également pour l'expression et la production en erlenmeyers des enzymes GAPN sauvage et mutées

1.3. Milieux de culture

Milieu riche LB :

Bactopeptone	10 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
H ₂ O distillée qsp	1 l

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

Milieu SOC (glucose) :

Bactotryptone	2% (p/v)
Extrait de levure	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Pour les milieux solides, 15 g de bacto-agar sont ajoutés par litre de milieu.

En cas de sélection par un antibiotique, 100 mg/l d'ampicilline est additionné au milieu.

2. Techniques de génie génétique

2.1. Transformation des bactéries supercompétentes (Inoue *et al.*, 1990)

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5 α . Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 18 et 20°C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 10 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10^{ème} du volume initial de solution TB, en présence de DMSO (7% final). Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80°C.

50 μ l de cellules supercompétentes et 0,1 à 2 ng d'ADN sont incubés 30 min dans la glace, puis le mélange est soumis à un choc thermique de 30 secondes à 42°C et enfin, placé 5 min dans la

glace. Les cellules sont régénérées en milieu SOC pendant 30 min sous agitation à 37°C avant d'être étalées sur boîte de Pétri, contenant l'antibiotique de sélection adapté, et incubées à 37°C.

2.2. Préparation de l'ADN plasmidique (Maniatis et al., 1989)

2.2.1. La minipréparation

La minipréparation d'ADN est une technique utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN (à partir de 2 à 5 ml de culture) dans un but d'analyse ou de criblage. Comme dans la technique du lysat clair, les cellules sont lysées par une solution contenant du lysozyme, puis l'ADN est dénaturé par de la soude. Après centrifugation, l'ADN plasmidique soluble est extrait par du phénol seul, puis par un mélange de phénol/chloroforme et précipité à l'alcool. Le culot ainsi obtenu est traité par la ribonucléase A et l'ADN plasmidique est précipité par un mélange PEG/NaCl.

2.2.2. La midipréparation

La préparation d'ADN plasmidique en quantités plus importantes a été réalisée à l'aide d'un kit de purification plasmidique (MACHEREY-NAGEL®).

Ce kit utilise la méthode de la lyse alcaline et permet de purifier le plasmide d'intérêt à l'aide d'une résine échangeuse d'anions.

2.3. Analyse de l'ADN sauvage et muté

2.3.1. Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification du fragment d'ADN d'intérêt a été réalisée à l'aide du Kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » commercialisé par Stratagene®. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* (6 fois plus fidèle dans la réplique de l'ADN que l'ADN polymérase thermostable *Taq*) pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse.

Elle nécessite aussi un plasmide double brin superenroulé et 2 oligodésoxyribonucléotides portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, vont servir d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase thermostable *Pfu*, conduisant à un plasmide muté aux extrémités non reliées (Figure XX, page106).

Conditions de PCR :

Oligodésoxyribonucléotide 1	100 ng
Oligodésoxyribonucléotide 2	100 ng
Tampon PCR 10x	5 µl
dNTP (1,25 mM de chaque)	8 µl
<i>Pfu</i> polymérase (Boehringer)	2 unités
H ₂ O qsp	50 µl

La réaction est effectuée sur un appareil Hybaid par répétition de 18 cycles, chaque cycle comprenant une étape de dénaturation (30 sec à 94°C), une étape d'hybridation (1 minute à 55°C) et une étape d'élongation (1 à 2 minutes par kb à 68°C).

Le produit de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn* I (séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, pour digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *Dpn* I.

Produit de PCR	50 µl
<i>Dpn</i> I	10 unités

Le mélange de digestion est ensuite incubé pendant 1 heure à 37°C, puis 10 minutes à 65°C pour stopper la digestion.

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

Une fraction du mélange de digestion est utilisée pour transformer des bactéries DH5α supercompétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et le répliquer. La transformation est réalisée avec 1 à 5 µl du mélange réactionnel et 50 µl de bactéries DH5α supercompétentes. Les cellules sont étalées sur boîte de LB avec ampicilline.

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

2.3.2. Mutagenèse dirigée par PCR

2.3.2.1. Principe de la méthode

La méthode utilisée est la même que lors de l'analyse de l'ADN plasmidique. Les oligonucléotides choisis sont complémentaires de la séquence du gène *gapN*, à l'exception des nucléotides qui nous permettent d'obtenir le résidu que nous cherchons à introduire dans la structure primaire de GAPN (cf. §2.3.1).

2.3.2.2. Vérification des mutations

Les mutations obtenues sont vérifiées par deux techniques. D'abord, les plasmides utilisés sont séquencés pour vérifier si le gène *gapN* porte effectivement la ou les mutations désirées. Ensuite, la masse des mutants protéiques est vérifiée par spectrométrie de masse.

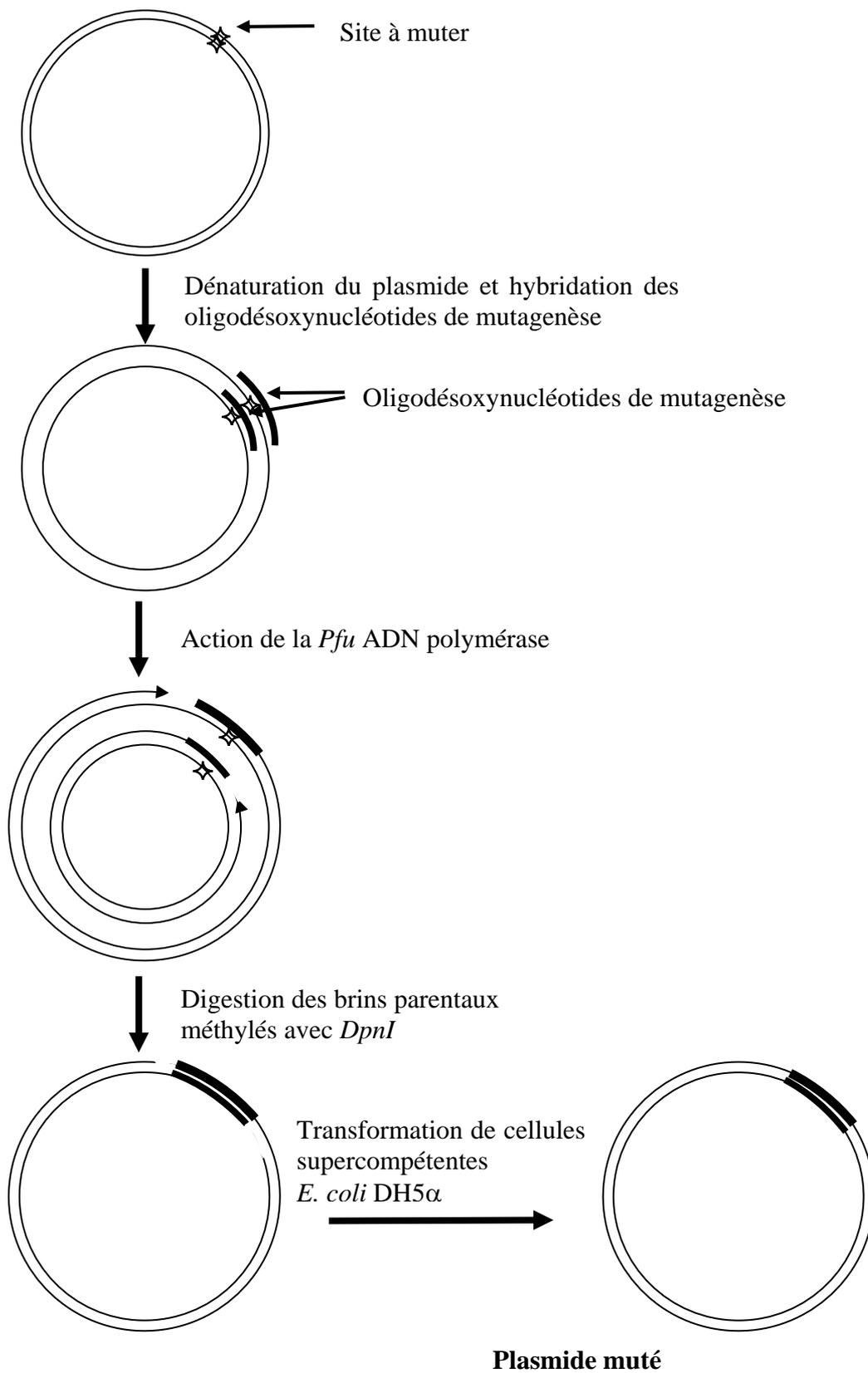


Figure 33 : Principe de la mutagenèse selon la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

2.3.3. Séquençage de l'ADN db

Le gène *gapN* est séquençé après mutagenèse, en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7, afin de vérifier la présence de la mutation recherchée et d'exclure la présence de mutations supplémentaires dans le gène *gapN* (Tabor & Richardson, 1987).

1^{ère} étape : Dénaturation de l'ADN db circulaire

ADN plasmidique db	0,5 pmole
NaOH 2,5 N	2 µl
H ₂ O qsp	20 µl

Le mélange est incubé 5 min à température ambiante.

2^{ème} étape : Hybridation de l'amorce nucléotidique

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

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

Le culot est repris dans :

H ₂ O	8 µl
Tampon 5x	2 µl
(Tris-HCl 200 mM, MgCl ₂ 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5)	

Le mélange est incubé pendant 15 min à 37°C.

3^{ème} étape : Elongation

Ajout de :

(α - ³³ P)dATP	5 µCi
dithiothréitol (DTT) 100 mM	1 µl
T7 ADN polymérase	2 unités
Mélange d'extension 5x	2 µl
(dCTP, dGTP, dTTP 7,5 µM chacun)	

Le mélange est incubé 5 min à température ambiante.

4^{ème} étape : Arrêt de la réaction

Mélange précédent	3,5 µl
-------------------	--------

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

Le mélange est incubé 5 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 4 µl de bleu de formamide. Les produits de la réaction sont fractionnés sur un gel de polyacrylamide dénaturant (polyacrylamide 6%/urée 8 M). Après migration, l'ADN est fixé sur le gel par trempage dans de l'acide acétique 10% (v/v). Les bandes d'ADN élongué sont révélées par autoradiographie.

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

3.1. Production des enzymes GAPN de type sauvage et mutées

L'enzyme GAPN est produite dans la souche DH5α transformée par le plasmide recombinant pDB125KS N/N portant le gène de la protéine GAPN sauvage ou mutée.

Les cultures sontensemencées au 1/100^{ème} en milieu LB supplémenté en ampicilline (200 mg/l) et en CaCl₂ (15 mM). Elles sont incubées pendant 24 heures à 37°C, sous agitation. Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 g, sont lavées au tampon A (Saccharose 25%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 5mM, pH 7,5) et stockées à -20°C.

3.2. Purification

3.2.1. Protocole classique

3.2.1.1. Sonication et précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium

Le culot cellulaire, issu d'1 litre de culture, est repris dans 15 ml de tampon de purification (KPi 50 mM, pH 6,4) et soniqué à 0°C sous une puissance de 20W pendant 1,5 minutes, par périodes de 1 seconde d'ultrasons et 1 seconde d'arrêt. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 30000g pendant 1 heure.

Le surnageant de sonication est amené à 50% de saturation en sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ et est laissé pendant 1 heure à 4°C. La protéine, restée en solution, est récupérée dans le surnageant après centrifugation pendant 1h à 30000g et le surnageant est amené à 90% de saturation en sulfate d'ammonium. A cette concentration en sel, l'enzyme précipite et une dernière centrifugation après 2,5 h à 4°C permet de la récupérer dans le culot.

3.2.1.2. Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification puis déposé sur une colonne de gel filtration ACA 34 (acrylamide 3%, agarose 4%, BIOSEPPRA[®]) dont le domaine de fractionnement se situe entre 20 et 350 kDa. L'élution s'effectue dans le même tampon et est suivie par la lecture de la DO à 260 et 280 nm. Les fractions contenant la protéine (fractions pour lesquelles le rapport DO_{280}/DO_{260} est proche de 1) sont rassemblées.

3.2.1.3. Chromatographie échangeuse d'anions

La solution contenant l'enzyme GAPN est diluée pour obtenir une DO_{280} égale à 1 puis injectée sur une colonne Sépharose Q préparative (agarose 6% comprenant des groupements triméthylammonium méthyles, Pharmacia[®]), équilibrée dans le tampon KPi 50 mM, pH 6,4 et couplée à un système FPLC (Pharmacia[®]). L'élution se fait par un gradient de KCl de 0 à 1 M dans le même tampon. Cette étape permet de séparer l'enzyme des fragments d'acides nucléiques encore présents après filtration sur gel. Les fractions contenant la protéine GAPN sont rassemblées.

3.2.1.4. Chromatographie hydrophobe

Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la protéine GAPN sont amenées à une concentration finale de 1 M en sulfate d'ammonium. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl Sepharose préparative (agarose 6% comprenant des groupements phényles, Pharmacia[®]) équilibrée dans le tampon KPi 50 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1 M à pH 6,4 et couplée à un système FPLC (Pharmacia[®]). L'enzyme est éluée par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en $(NH_4)_2SO_4$ sous un débit de 5 ml/min. Cette dernière étape permet de purifier la protéine GAPN à homogénéité.

Les fractions contenant l'enzyme sont rassemblées et concentrées par filtration sous pression sur une membrane Amicon YM30. A ce stade, la protéine GAPN est pure et peut être conservée à $-20^\circ C$ sous forme précipitée en présence de sulfate d'ammonium (90% de saturation) et de β -mercaptoéthanol (5mM).

3.2.2. Amélioration du protocole classique

Ce protocole nous permet d'obtenir GAPN pure en une journée, contrairement au protocole classique qui nécessite deux jours de travail puisque l'étape de filtration sur gel se déroule durant la nuit.

3.2.2.1. Sonication et précipitation au sulfate d'ammonium

Lors de cette étape, la sonication se passe de la même façon que pour le protocole classique. Mais il n'y a qu'une seule précipitation fractionnée en présence de 40% de saturation en sulfate d'ammonium. La protéine, restée en solution, est récupérée dans le surnageant après centrifugation pendant 45 minutes à 3000g.

3.2.2.2. Chromatographie hydrophobe

Le surnageant issu de la sonication et contenant la protéine GAPN est amené à une concentration finale de 1 M en sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl Sepharose préparative (agarose 6 % comprenant des groupements phényles, Pharmacia[®]) équilibrée dans le tampon KPi 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M à pH 6,4 et couplée à un système FPLC (Pharmacia[®]). L'enzyme est éluée par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sous un débit de 5 ml/min. Cette étape permet d'éliminer les acides nucléiques présents dans le surnageant de précipitation.

3.2.2.3. Chromatographie échangeuses d'anions

Les fractions contenant l'enzyme GAPN sont diluées pour obtenir une DO_{280} égale à 1 puis injectée sur une colonne Sépharose Q préparative (agarose 6% comprenant des groupements triméthylammonium méthyles, Pharmacia[®]), équilibrée dans le tampon KPi 50 mM, pH 6,4 et couplée à un système FPLC (Pharmacia[®]). L'éluion se fait par un gradient de KCl de 0 à 1 M dans le même tampon. Cette dernière étape permet de purifier la protéine GAPN à homogénéité.

Les fractions contenant la protéine GAPN sont rassemblées et concentrées par filtration sous pression sur une membrane Amicon YM30. A ce stade, la protéine GAPN est pure et peut être conservée à -20°C sous forme précipitée en présence de sulfate d'ammonium (90% de saturation) et de β -mercaptoéthanol (5mM).

3.3. Caractérisation des enzymes GAPN de type sauvage et mutées

3.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

Ce type d'électrophorèse (Laemmli, 1970) permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification. Après concentration des protéines par migration dans un gel à 5%, celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 7,5%. Les échantillons sont dénaturés par chauffage avant dépôt et le gel, ainsi que le tampon d'électrophorèse (tampon glycine), contiennent du dodécylsulfate de sodium (SDS).

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

3.3.2. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire du monomère de GAPN après purification est déterminée par spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électrospray. Etant donné que cette technique nécessite un échantillon débarrassé de toute trace de sels, la solution de la protéine est injectée sur une colonne analytique en phase inverse (C8) puis éluée par un gradient linéaire de 0 à 80 % en acétonitrile. L'échantillon lyophilisé est ensuite analysé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique UMR CNRS-ULP 7509 à Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer.

3.3.3. Mesure de la concentration

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en prenant pour l'enzyme tétramérique comme coefficient d'extinction molaire $2,04 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, coefficient déterminé selon la méthode de Scopes (Scopes, 1974).

3.3.4. Test enzymatique

Les tests d'activité sont effectués dans un tampon (TES 50 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, pH 8,2) en présence de 1 mM NADP et de 0,2 mM D,L-G3P dans un volume de 1 ml en suivant l'apparition de NADH à 340 nm en fonction du temps. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en μmoles de NADH produit par minute et par unité de DO à 280 nm.

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

4.1. Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire des différents mutants protéiques générés

Le principe de ces déterminations est de faire varier la concentration d'un substrat, tout en gardant celle de l'autre fixe. Les concentrations en enzyme ont été choisies de façon à mesurer la vitesse initiale de la réaction sur toute la gamme de concentrations des substrats.

Cette méthode permet de déterminer les constantes d'affinités apparentes pour le cofacteur NADP et pour le substrat D-G3P.

Les mesures d'activité (cf. §3.3.4) ont été réalisées dans un tampon TES 50 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, pH 8,2 en faisant varier la concentration du substrat à étudier (NADP ou D-G3P), l'autre substrat se trouvant à concentration saturante. Les concentrations en enzyme ont été choisies de façon à mesurer la vitesse initiale de la réaction sur toute la gamme de concentrations variable du substrat. Les points expérimentaux ont été analysés par régression non linéaire avec l'équation (1) de Michaelis-Menten dans le cas du cofacteur NADP et avec l'équation (2) de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le substrat dans le cas du D-G3P (Fersht, 1985). Dans le cas des mutants T244S et L427G, les résultats expérimentaux obtenus avec le G3P sont ajustés à l'équation de Michaelis-Menten (1). Pour le mutant T244S, les résultats obtenus pour le NADP sont ajustés avec l'équation (2).

Equation (1)
$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Equation (2)
$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_M + [S] + [S]^2 / K_I}$$

4.2. Mesure de la constante de vitesse k_{cat} en fonction du pH dans les conditions de phase stationnaire

Les conditions expérimentales et l'analyse des résultats sont décrites avec précision dans le chapitre "Materials and Methods" de l'article 1 p. 58.

Les conditions expérimentales utilisées pour les mutants protéiques E268D, R459K, L174A, L427G, F465Y, F465L, Q476A de GAPN sont identiques à celles décrites dans l'article pour le mutant protéique K178A.

4.3. Etudes de l'étape d'acylation en cinétique de mélange rapide (Stopped-flow)

Les conditions expérimentales et l'analyse des résultats sont décrites avec précision dans le chapitre "Materials and Methods" de l'article 1 p. 58. Les conditions expérimentales utilisées pour les mutants E268D, R459K, L427G, L174A, Q476A de GAPN sont identiques à celles décrites dans l'article pour le mutant K178A.

4.4. Mesure de l'effet isotopique en présence de D-[1-²H]G3P

4.4.1. Synthèse de D-[1-²H]G3P

Le [4-²H]NAD est préparé à partir de [4-CN]NAD, obtenu par incubation de NAD (80 mM) avec du KCN (1 M) dans D₂O, suivi par deux étapes d'échange dans D₂O à pH acide (~5). Le [4-²H]NAD est purifié par chromatographie échangeuse d'anions (colonne Sépharose Q, Pharmacia®) élué par un gradient de bicarbonate d'ammonium pH 9,5 (gradient de 0 à 0,4 M). Le [4-²H]NAD est élué à 0,12 M. Les fractions correspondantes sont rassemblées et lyophilisées.

Le [4B-²H]NADH est préparé par incubation de [4-²H]NAD (80 mM) et d'éthanol (5 M) dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,8 en présence de 40 unités d'alcool déshydrogénase de levure (Sigma) à 26°C jusqu'à l'équilibre. L'enzyme est éliminée par filtration et le [4B-²H]NADH est purifié par chromatographie échangeuse d'anions comme cela est décrit pour le NAD. Le [4B-²H]NADH est élué à 0,05 M de bicarbonate d'ammonium. Les fractions dont le rapport des DO (DO₂₆₀/ DO₃₄₀) est inférieur ou égal à 2,3, sont rassemblées et lyophilisées.

Le D-[1-²H]G3P est obtenu par incubation d'1,3 dPG (3,5 mM) et de [4B-²H]NADH (3,5 mM) dans du tampon PIPES 10 mM, pH 7,1, en présence de 1,25 nM de GAPDH sauvage d'*E. coli* à 22°C, jusqu'à ce que la réaction soit totale. L'enzyme est éliminée par filtration et le D-[1-²H]G3P est purifié par une chromatographie échangeuse d'anions (colonne Sépharose Q, Pharmacia®). Les tampons utilisés sont des tampons PIPES 10 mM, pH 7,1, avec KCl 1 M pour l'élué. Le D[1-²H]G3P est élué à 0,25 M en KCl, les fractions sont rassemblées, concentrées par évaporation de l'eau au rotavapor et stockées à -80°C en aliquots de 0,5 ml.

4.4.2. Mesure de l'effet isotopique de substrat

Les conditions expérimentales des mesures d'effets isotopiques sont décrites avec précision dans le chapitre "Materials and Methods" de l'article 1 p. 58.

5. Techniques d'étude de la réactivité de la Cys302 dans les enzymes mutées T244S et T244S/C382S

L'utilisation de sonde chimique cinétique telle le 2,2'-dithiodipyridine (2PDS) a permis d'appréhender la réactivité de la Cys302 dans l'enzyme sauvage et les différents mutants.

Les conditions expérimentales sont décrites avec précision dans le chapitre "Materials and Methods" de l'article 1 p. 58.

6. Mesure du nombre de NADP présent dans le mutant T244S après purification

Les conditions expérimentales utilisées pour connaître le nombre de molécules de NADP présents dans le mutant protéique T244S sont décrites dans le chapitre "Materials and Methods" de la publication 1 p. 58.

7. Influence des mutations générées sur la stabilité de la protéine GAPN

7.1. Evaluation de l'impact des mutations par dichroïsme circulaire

Le principe de ces mesures est de comparer les spectres obtenus sur l'enzyme sauvage et sur les mutants T244S et K178A pour voir d'éventuelles modifications dans l'environnement protéique des acides aminés aromatiques, essentiellement tryptophane et tyrosine.

Les mesures sont effectuées dans un tampon KPi 10mM, pH 7,1 sur un spectropolarimètre JOBIN-YVON® CD6, la concentration en protéine est de 0,1 mg/ml pour les mesures dans l'UV lointain et de 0,8 mg/ml pour les mesures réalisées dans l'UV proche. Les spectres sont réalisés dans une gamme de longueurs d'onde allant de 190nm à 250 nm pour les études dans l'UV lointain et de 250nm à 300nm pour celles réalisées dans l'UV proche. Ces mesures sont réalisées avec un pas de 1nm, à une température de 25°C. Une moyenne de 4 spectres est réalisée pour chaque mesure.

7.2. Evaluation de l'impact des mutations sur la stabilité thermodynamique du site actif par Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Le principe de la mesure est de comparer les T_M (maximum des pics de dénaturation thermique) obtenus pour l'enzyme sauvage et les mutants T244S et K178A.

Les mesures sont effectuées dans un tampon KPi 50mM, pH 8,2 sur un microcalorimètre VP-DSC microcalorimeter (Microcal[®], Inc.), la concentration en protéine est de 1 mg/ml. Le tampon de dialyse est utilisé pour la cellule de référence et pour enregistrer la ligne de base. Avant toute mesure, les échantillons de protéine sont dégazés 2 fois pendant 7 minutes à l'aide d'une pompe à vide. La vitesse de scan est $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les endothermes sont analysés par le logiciel Microcal ORIGIN[®] selon un modèle à deux états.

7.3. Influence des mutations de la position Pro464 sur l'état oligomérique de la GAPN de *S. mutans* : filtration sur gel Superose 12 couplée au système HPLC

Le support chromatographique de cette colonne est constitué de particules d'agarose réticulé de 10 μm de diamètre. Les pores représentent 55% du volume et la gamme de séparation s'étend de 1 à 300 kDa. L'injection du mutant protéique P464A (0,5 mg dans 200 μl) se fait grâce à une boucle d'injection avec un débit de tampon phosphate (KPi 50 mM, pH 8,2) de 0,2 ml/min. La colonne, d'une contenance de 23 ml, a été étalonnée avec un mélange de marqueurs de poids moléculaires. La détermination du volume mort (V_0) et du volume total (V_t), respectivement 6,9 et 18,2 ml, permet de calculer le coefficient de partition K_{av} selon l'équation $K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)}$ avec V_e volume d'élution de la protéine.

Références bibliographiques

- Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. et Vrieling, A.** (2000). Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem. J.*, **349**, 853-61.
- Allali-Hassani, A., Peralba, J. M., Martras, S., Farres, J. et Pares, X.** (1998). Retinoids, omega-hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H₂-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.*, **426**, 362-6.
- Amanvermez, R., Demir, S., Tuncel, O. K., Alvur, M. et Agar, E.** (2005). Alcohol-induced oxidative stress and reduction in oxidation by ascorbate/L-cys/ L-met in the testis, ovary, kidney, and lung of rat. *Adv. Ther.*, **22**, 548-58.
- Ambroziak, W., Kosley, L. L. et Pietruszko, R.** (1989). Human aldehyde dehydrogenase: coenzyme binding studies. *Biochemistry*, **28**, 5367-73.
- Ansari, N. H., Wang, L. et Srivastava, S. K.** (1996). Role of lipid aldehydes in cataractogenesis: 4-hydroxynonenal-induced cataract. *Biochem. Mol. Med.*, **58**, 25-30.
- Armstrong, J. M. et Trentham, D. R.** (1976). The reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate with thiols and the holoenzyme of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and of inorganic phosphate with the acyl-holoenzyme. *Biochem. J.*, **159**, 513-27.
- Banditelli, S., Boldrini, E., Vilardo, P. G., Cecconi, I., Cappiello, M., Dal Monte, M., Marini, I., Del Corso, A. et Mura, U.** (1999). A new approach against sugar cataract through aldose reductase inhibitors. *Exp. Eye Res.*, **69**, 533-8.
- Bardag-Gorce, F., Li, J., French, B. A. et French, S. W.** (2005). The effect of ethanol-induced CYP2E1 on proteasome activity: the role of 4-hydroxynonenal. *Exp. Mol. Pathol.*, **78**, 109-15.
- Bateman, O. A., Purkiss, A. G., van Montfort, R., Slingsby, C., Graham, C. et Wistow, G.** (2003). Crystal structure of eta-crystallin: adaptation of a class 1 aldehyde dehydrogenase for a new role in the eye lens. *Biochemistry*, **42**, 4349-56.
- Bennett, A. F., Buckley, P. D. et Blackwell, L. F.** (1983). Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry*, **22**, 776-84.
- Biellmann, J. F., Eid, P. et Hirth, C.** (1980). Affinity labeling of the *Escherichia coli* aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase with an alkylating coenzyme analogue. Half-site reactivity and competition with the substrate alkylating analogue. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 65-9.
- Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E. et Wonacott, A. J.** (1977). Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, **266**, 328-33.
- Blackwell, L. F., Motion, R. L., MacGibbon, A. K., Hardman, M. J. et Buckley, P. D.** (1987). 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.*, **242**, 803-8.
- Bostian, K. A. et Betts, G. F.** (1978). Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **173**, 787-98.
- Bradbury, S. L. et Jakoby, W. B.** (1971). Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1834-40.

Bustos, D. M. et Iglesias, A. A. (2002). Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). FEBS Lett., **530**, 169-73.

Bustos, D. M. et Iglesias, A. A. (2003). Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. Plant Physiol., **133**, 2081-8.

Byers, D. et Meighen, E. (1984). *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., **259**, 7109-14.

Canellas, P. F. et Cleland, W. W. (1991). Carbon-13 and deuterium isotope effects on the reaction catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **30**, 8871-6.

Canuto, R. A., Maggiora, M., Trombetta, A., Martinasso, G. et Muzio, G. (2003). Aldehyde dehydrogenase 3 expression is decreased by clofibrate via PPAR gamma induction in JM2 rat hepatoma cell line. Chem. Biol. Interact., **143-144**, 29-35.

Cao, Q., Mak, K. M. et Lieber, C. S. (2002). Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases acetaldehyde-induced TNF-alpha generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats. Biochem. Biophys. Res. Commun., **299**, 459-64.

Cerff, R. et Chambers, S. E. (1978). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba* L. Isolation and electrophoretic characterization of isoenzymes. Hoppe Seylers Z Physiol. Chem., **359**, 769-72.

Chang, G. W. et Kam, P. C. (1999). The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. Anaesthesia, **54**, 42-50.

Chang, Q., Harter, T. M., Rikimaru, L. T. et Petrash, J. M. (2003). Aldo-keto reductases as modulators of stress response. Chem. Biol. Interact., **143-144**, 325-32.

Chen, Y. J., Yuan, C. C., Chow, K. C., Wang, P. H., Lai, C. R., Yen, M. S. et Wang, L. S. (2005). Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase is associated with cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer patients. Gynecol. Oncol., **97**, 110-7.

Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. et Aubry, A. (1999). Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J. Mol. Biol., **290**, 161-73.

Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. et Aubry, A. (2000). Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J. Mol. Biol., **300**, 141-52.

Coleman, M., Vontas, J. G. et Hemingway, J. (2002). Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. Eur. J. Biochem., **269**, 768-79.

Corbier, C., Michels, S., Wonacott, A. J. et Branlant, G. (1994). Characterization of the two anion-recognition sites of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* by site-directed mutagenesis and chemical modification. Biochemistry, **33**, 3260-5.

Corbier, C., Mougin, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A. et Branlant, G. (1990). The nicotinamide subsite of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by site-directed mutagenesis. Biochimie, **72**, 545-54.

- D**ai, X., Hayashi, K., Nozaki, H., Cheng, Y. et Zhao, Y. (2005). Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtinol in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **102**, 3129-34.
- Davydov, V. V., Dobaeva, N. M. et Bozhkov, A. I. (2004). Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. Exp. Gerontol., **39**, 11-6.
- Del Rio, D., Stewart, A. J. et Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., **15**, 316-28.
- Demozay, D., Rocchi, S., Mas, J. C., Grillo, S., Pirola, L., Chavey, C. et Van Obberghen, E. (2004). Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. J. Biol. Chem., **279**, 6261-70.
- Dickinson, F. M. et Hart, G. J. (1982). Kinetic studies of the mechanism of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. Prog. Clin. Biol. Res., **114**, 11-22.
- Dobbs-McAuliffe, B., Zhao, Q. et Linney, E. (2004). Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. Mech. Dev., **121**, 339-50.
- Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. Eur. J. Biochem., **267**, 4315-24.
- Duggleby, R. G. et Dennis, D. T. (1974a). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. J. Biol. Chem., **249**, 167-74.
- Duggleby, R. G. et Dennis, D. T. (1974b). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Effect of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds on the enzyme-catalyzed arsenolysis of 1,3-diphosphoglyceric acid. J. Biol. Chem., **249**, 175-81.
- E**ckfeldt, J. H. et Yonetani, T. (1976). Kinetics and mechanism of the F1 isozyme of horse liver aldehyde dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys., **173**, 273-81.
- F**arres, J., Guan, K. L. et Weiner, H. (1989). Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences. Eur. J. Biochem., **180**, 67-74.
- Farres, J., Wang, T. T., Cunningham, S. J. et Weiner, H. (1995). Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. Biochemistry, **34**, 2592-8.
- Farres, J., Wang, X., Takahashi, K., Cunningham, S. J., Wang, T. T. et Weiner, H. (1994). Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. J. Biol. Chem., **269**, 13854-60.
- Feldman, R. I. et Weiner, H. (1972). Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. J. Biol. Chem., **247**, 267-72.
- Ferri, G., Comerio, G., Iadarola, P., Zapponi, M. C. et Speranza, M. L. (1978). Subunit structure and activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, **522**, 19-31.
- Fersht, A. (1985). Enzyme structure and mechanism. Enzyme structure and mechanism, Freeman & Co.,

- Fillinger, S., Boschi-Muller, S., Azza, S., Dervyn, E., Branlant, G. et Aymerich, S.** (2000). Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14031-7.
- Fliege, R., Flugge, U. I., Werdan, K. et Heldt, H. W.** (1978). Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 232-47.
- G arattini, E., Mendel, R., Romao, M. J., Wright, R. et Terao, M.** (2003). Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem. J.*, **372**, 15-32.
- Gibson, K. M.** (2005). Gamma-hydroxybutyric aciduria: a biochemist's education from a heritable disorder of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **28**, 247-65.
- Gibson, K. M., Lee, C. F., Bennett, M. J., Holmes, B. et Nyhan, W. L.** (1993). Combined malonic, methylmalonic and ethylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase deficiencies: an inborn error of beta-alanine, L-valine and L-alloisoleucine metabolism? *J. Inherit. Metab. Dis.*, **16**, 563-7.
- Gouet, P., Robert, X. et Courcelle, X.** (2003). ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3320-3323.
- Graham, C., Hodin, J. et Wistow, G.** (1996). A retinaldehyde dehydrogenase as a structural protein in a mammalian eye lens. Gene recruitment of eta-crystallin. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15623-8.
- Gray, R. G., Pollitt, R. J. et Webley, J.** (1987). Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: demonstration of defective valine and beta-alanine metabolism and reduced malonic semialdehyde dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **38**, 121-4.
- Greene, W. K., Bahn, S., Masson, N. et Rabbitts, T. H.** (1998). The T-cell oncogenic protein HOX11 activates Aldh1 expression in NIH 3T3 cells but represses its expression in mouse spleen development. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7030-7.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M. et Cambillau, C.** (2004). Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, **343**, 29-41.
- H abenicht, A., Hellman, U. et Cerff, R.** (1994). Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. Mol. Biol.*, **237**, 165-71.
- Hammen, P. K., Allali-Hassani, A., Hallenga, K., Hurley, T. D. et Weiner, H.** (2002). Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **41**, 7156-68.
- Harrigan, P. J. et Trentham, D. R.** (1974). Kinetic studies on oxidized nicotinamide--adenine dinucleotide-facilitated reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.*, **143**, 353-63.
- Harris, J. I. et Waters, M.** (1976). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. The Enzymes 3rd ed., Boyer, P.D., Ed., New York, Academic Press, 1-49.

- Hempel, J. et Lindahl, R.** (1989). Class III aldehyde dehydrogenase from rat liver: superfamily relationship to classes I and II and functional interpretations. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **290**, 3-17.
- Hille, R.** (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 107-16.
- Ho, K. K., Allali-Hassani, A., Hurley, T. D. et Weiner, H.** (2005). Differential effects of Mg^{2+} ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*, **44**, 8022-9.
- Ho, K. K., Hurley, T. D. et Weiner, H.** (2006). Selective alteration of the rate-limiting step in cytosolic aldehyde dehydrogenase through random mutagenesis. *Biochemistry*, **45**, 9445-53.
- Hsiang, C. Y., Wu, S. L., Cheng, S. E. et Ho, T. Y.** (2005). Acetaldehyde-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HepG2 cells. *J. Biomed. Sci.*, **12**, 791-801.
- Hu, C. A., Lin, W. W. et Valle, D.** (1996). Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9795-800.
- Hurley, T. D., Perez-Miller, S. et Breen, H.** (2001). Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 3-14.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V. et Penning, T. M.** (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 621-31.
- Inoue, H., Nojima, H. et Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-8.
- Jez, J. M., Flynn, T. G. et Penning, T. M.** (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 639-47.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. et Eklund, H.** (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.*, **7**, 2106-17.
- Karsten, W. E. et Viola, R. E.** (1992). Identification of an essential cysteine in the reaction catalyzed by aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121**, 234-8.
- Kraemer, R. J. et Deitrich, R. A.** (1968). Isolation and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6402-8.
- Laeemli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N. et Fillastre, J. P.** (2004). The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathol. Biol. (Paris)*, **52**, 314-22.
- Lamb, A. L. et Newcomer, M. E.** (1999). The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry*, **38**, 6003-11.
- Larson, H. N., Weiner, H. et Hurley, T. D.** (2005). Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30550-6.

- LeBrun, L. A., Park, D. H., Ramaswamy, S. et Plapp, B. V.** (2004). Participation of histidine-51 in catalysis by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **43**, 3014-26.
- Leclerc, J., Des Rosiers, C., Montgomery, J. A., Brunet, J., Ste-Marie, L., Reider, M. W., Fernandez, C. A., Powers, L., David, F. et Brunengraber, H.** (1995). Metabolism of R-beta-hydroxypentanoate and of beta-ketopentanoate in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, **268**, E446-52.
- Lee, Y. S., Hodoseck, M., Brooks, B. R. et Kador, P. F.** (1998). Catalytic mechanism of aldose reductase studied by the combined potentials of quantum mechanics and molecular mechanics. *Biophys. Chem.*, **70**, 203-16.
- Levy, L. M. et Betts, G. F.** (1989). Stereospecificity of C4 nicotinamide hydrogen transfer of the NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 331-3.
- Lieber, C. S.** (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta*, **257**, 59-84.
- Lin, J. T., Wu, M. S., Wang, W. S., Yen, C. C., Chiou, T. J., Liu, J. H., Yang, M. H., Chao, T. C., Chou, S. C. et Chen, P. M.** (2003). All-trans retinoid acid increases Notch1 transcript expression in acute promyelocytic leukemia. *Adv. Ther.*, **20**, 337-43.
- Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C. L. et Yoshida, A.** (1996). Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, **34**, 376-80.
- Lin, Z., Carney, G. et Rizzo, W. B.** (2000). Genomic organization, expression, and alternate splicing of the mouse fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Mol. Genet. Metab.*, **71**, 496-505.
- Lindahl, R.** (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 283-335.
- Lindahl, R. et Evces, S.** (1984). Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11991-6.
- Liu, L. et Huskey, W. P.** (1992). Progress in establishing the rate-limiting features and kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. *Biochemistry*, **31**, 6898-903.
- Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. et Wang, B. C.** (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 317-26.
- Llamas, K., Owens, M., Blakeley, R. L. et Zerner, B.** (1986). N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's Reagent K) as a reagent for nucleophilic side chain of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5543-5548.
- MacGibbon, A. K., Blackwell, L. F. et Buckley, P. D.** (1977). Pre-steady-state kinetic studies on cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.*, **167**, 469-77.
- Maly, I. P., Crotet, V. et Toranelli, M.** (2003). The so-called "testis-specific aldehyde dehydrogenase" corresponds to type 2 retinaldehyde dehydrogenase in the mouse. *Histochem. Cell. Biol.*, **119**, 169-74.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. et Sambrook, J.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Manini, P., La Pietra, P., Panzella, L., Napolitano, A. et d'Ischia, M.** (2006). Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1828-33.
- Manjasetty, B. A., Powlowski, J. et Vrieling, A.** (2003). Crystal structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 6992-7.
- Mann, C. J. et Weiner, H.** (1999). Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci.*, **8**, 1922-9.
- Marchal, S. et Branlant, G.** (1999). Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*, **38**, 12950-8.
- Marchal, S. et Branlant, G.** (2001). Engineered nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase at position 268 binds hydroxylamine and hydrazine as acyl acceptors. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5764-70.
- Marchal, S. et Branlant, G.** (2002). Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 39235-42.
- Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tete-Favier, F., Aubry, A. et Branlant, G.** (2001). Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 15-28.
- Marchal, S., Rahuel-Clermont, S. et Branlant, G.** (2000). Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*, **39**, 3327-35.
- Matsunaga, T., Shintani, S. et Hara, A.** (2006). Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 1-18.
- Merlin, C., Francois, M. C., Bozzolan, F., Pelletier, J., Jacquin-Joly, E. et Maibeche-Coisne, M.** (2005). A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 4-10.
- Meunier, J. C. et Dalziel, K.** (1978). Kinetic studies of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *Eur. J. Biochem.*, **82**, 483-92.
- Michels, S., Scagliarini, S., Della Seta, F., Carles, C., Riva, M., Trost, P. et Branlant, G.** (1994). Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *FEBS Lett.*, **339**, 97-100.
- Miyauchi, K., Masaki, R., Taketani, S., Yamamoto, A., Akayama, M. et Tashiro, Y.** (1991). Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA for rat liver microsomal aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19536-42.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. et Baker, E. N.** (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*, **6**, 1541-51.
- Napoli, J. L.** (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 139-62.

Ni, L., Sheikh, S. et Weiner, H. (1997). Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18823-6.

Ni, L., Zhou, J., Hurley, T. D. et Weiner, H. (1999). Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. *Protein Sci.*, **8**, 2784-90.

Orsi, B. A. et Cleland, W. W. (1972). Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **11**, 102-9.

Panoutsopoulos, G. I. (2005). Phenylacetaldehyde oxidation by freshly prepared and cryopreserved guinea pig liver slices: the role of aldehyde oxidase. *Int. J. Toxicol.*, **24**, 103-9.

Pappa, A., Chen, C., Koutalos, Y., Townsend, A. J. et Vasiliou, V. (2003a). Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 1178-89.

Pappa, A., Estey, T., Manzer, R., Brown, D. et Vasiliou, V. (2003b). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem. J.*, **376**, 615-23.

Park, K. S., Cho, S. Y., Kim, H. et Paik, Y. K. (2002). Proteomic alterations of the variants of human aldehyde dehydrogenase isozymes correlate with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, **97**, 261-5.

Payne, R. C., Nichols, B. P. et Hecht, S. M. (1987). *Escherichia coli* tryptophan synthase: synthesis of catalytically competent alpha subunit in a cell-free system containing preacylated tRNAs. *Biochemistry*, **26**, 3197-205.

Perez-Miller, S. J. et Hurley, T. D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **42**, 7100-9.

Piatigorsky, J., Kozmik, Z., Horwitz, J., Ding, L., Carosa, E., Robison, W. G., Jr., Steinbach, P. J. et Tamm, E. R. (2000). Omega -crystallin of the scallop lens. A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 enzyme-crystallin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41064-73.

Plapp, B. V., Mitchell, J. L. et Berst, K. B. (2001). Mouse alcohol dehydrogenase 4: kinetic mechanism, substrate specificity and simulation of effects of ethanol on retinoid metabolism. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 445-56.

Pohl, E., Brunner, N., Wilmanns, M. et Hensel, R. (2002). The crystal structure of the allosteric non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19938-45.

Pollitt, R. J., Green, A. et Smith, R. (1985). Excessive excretion of beta-alanine and of 3-hydroxypropionic, R- and S-3-aminoisobutyric, R- and S-3-hydroxyisobutyric and S-2-(hydroxymethyl)butyric acids probably due to a defect in the metabolism of the corresponding malonic semialdehydes. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **8**, 75-9.

Rahuel-Clermont, S., Arutyunov, D., Marchal, S., Orlov, V., Muronetz, V. et Branlant, G. (2005). Thermal destabilization of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* upon phosphate binding in the active site. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18590-7.

Reimers, M. J., Hahn, M. E. et Tanguay, R. L. (2004). Two zebrafish alcohol dehydrogenases share common ancestry with mammalian class I, II, IV, and V alcohol

dehydrogenase genes but have distinct functional characteristics. *J. Biol. Chem.*, **279**, 38303-12.

Rodriguez-Zavala, J. S. et Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry*, **41**, 8229-37.

Rooseboom, M., Commandeur, J. N. et Vermeulen, N. P. (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 53-102.

Rossmann, M. G., Moras, D. et Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-9.

Sakuraba, H. et Ohshima, T. (2002). Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway. *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 441-8.

Salway, J. G. (1999). Metabolism at a glance - second edition. *Blackwell Science, London*,

Schlegel, B. P., Ratnam, K. et Penning, T. M. (1998). Retention of NADPH-linked quinone reductase activity in an aldo-keto reductase following mutation of the catalytic tyrosine. *Biochemistry*, **37**, 11003-11.

Scopes, R. K. (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.*, **59**, 277-82.

Segal, H. L. et Boyer, P. D. (1953). The role of sulfhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **204**, 265-81.

Seike, K., Murata, M., Hirakawa, K., Deyashiki, Y. et Kawanishi, S. (2004). Oxidative DNA damage induced by benz[a]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1445-51.

Sekimoto, H., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y. et Koshiha, T. (1997). Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15280-5.

Shearer, G. L., Kim, K., Lee, K. M., Wang, C. K. et Plapp, B. V. (1993). Alternative pathways and reactions of benzyl alcohol and benzaldehyde with horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **32**, 11186-94.

Shone, C. C. et Fromm, H. J. (1981). Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **20**, 7494-501.

Siebers, B. et Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in *Archaea*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 695-705.

Skarzynski, T., Moody, P. C. et Wonacott, A. J. (1987). Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **193**, 171-87.

Skarzynski, T. et Wonacott, A. J. (1988). Coenzyme-induced conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.*, **203**, 1097-118.

Sohling, B. et Gottschalk, G. (1993). Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 121-7.

Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. et Hurley, T. D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, **5**, 701-11.

Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F. et Branlant, G. (2006). Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. Biochem. J., **395**, 107-15.

Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. et Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. Mutat. Res., **482**, 21-6.

Sultana, R. et Butterfield, D. A. (2004). Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. Neurochem. Res., **29**, 2215-20.

Sunkar, R., Bartels, D. et Kirch, H. H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. Plant J., **35**, 452-64.

Tabor, S. et Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **84**, 4767-71.

Takahashi, K., Brown, C. S. et Weiner, H. (1980a). Mechanism of the magnesium ion activation of the catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Adv. Exp. Med. Biol., **132**, 181-8.

Takahashi, K., Weiner, H. et Hu, J. H. (1980b). Increase in the stoichiometry of the functioning active sites of horse liver aldehyde dehydrogenase in the presence of magnesium ions. Arch. Biochem. Biophys., **205**, 571-8.

Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. P. et Branlant, G. (1998). Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *bacteria* and *archaea* via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. Eur. J. Biochem., **252**, 447-57.

Testore, G., Cravanzola, C. et Bedino, S. (1999). Aldehyde dehydrogenase from rat intestinal mucosa: purification and characterization of an isozyme with high affinity for gamma-aminobutyraldehyde. Int. J. Biochem. Cell. Biol., **31**, 777-86.

Trentham, D. R. (1968). Aspects of the chemistry of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **109**, 603-12.

Trentham, D. R. (1971a). Rate-determining processes and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **122**, 71-7.

Trentham, D. R. (1971b). Reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. Biochem. J., **122**, 59-69.

Trost, P. et Pupillo, P. (1993). Inhibition of spinach D-glyceraldehyde 3-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase (nonphosphorylating) by adenylate compounds: the effect of dead-end inhibitors on a steady state random reaction mechanism. Arch. Biochem. Biophys., **306**, 76-82.

Tsukamoto, N., Chen, J. et Yoshida, A. (1998). Enhanced expressions of glucose-6-phosphate dehydrogenase and cytosolic aldehyde dehydrogenase and elevation of reduced glutathione level in cyclophosphamide-resistant human leukemia cells. Blood Cells Mol. Dis., **24**, 231-8.

Vallari, R. C. et Pietruszko, R. (1981). Kinetic mechanism of the human cytoplasmic aldehyde dehydrogenase E1. Arch. Biochem. Biophys., **212**, 9-19.

- Vallari, R. C. et Pietruszko, R.** (1984a). Interaction of Mg^{2+} with human liver aldehyde dehydrogenase. I. Species difference in the mitochondrial isozyme. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4922-6.
- Vallari, R. C. et Pietruszko, R.** (1984b). Interaction of Mg^{2+} with human liver aldehyde dehydrogenase. II. Mechanism and site of interaction. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4927-33.
- Valverde, F., Losada, M. et Serrano, A.** (1999). Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli gap* mutant complemented with a plant *GapN* gene. *FEBS Lett.*, **449**, 153-8.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F. et Nebert, D. W.** (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, **9**, 421-34.
- Vaz, F. M., van Gool, S., Ofman, R., L, I. J. et Wanders, R. J.** (1999). Carnitine biosynthesis. Purification of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **466**, 117-24.
- Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. et Meighen, E.** (1995). Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP(+)-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry*, **34**, 16725-32.
- Wang, S. L., Wu, C. W., Cheng, T. C. et Yin, S. J.** (1990). Isolation of high-Km aldehyde dehydrogenase isoenzymes from human gastric mucosa. *Biochem. Int.*, **22**, 199-204.
- Wang, X., Sheikh, S., Saigal, D., Robinson, L. et Weiner, H.** (1996). Heterotetramers of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. A model to study the heterotetramers expected to be found in Oriental people. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31172-8.
- Wang, X. et Weiner, H.** (1995). Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **34**, 237-43.
- Warren, K. R. et Li, T. K.** (2005). Genetic polymorphisms: impact on the risk of fetal alcohol spectrum disorders. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, **73**, 195-203.
- Watanabe, K., Matsunaga, T., Kimura, T., Funahashi, T., Funae, Y., Ohshima, T. et Yamamoto, I.** (2002). Major cytochrome P450 enzymes responsible for microsomal aldehyde oxygenation of 11-oxo-Delta8-tetrahydrocannabinol and 9-anthraldehyde in human liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 516-21.
- Weiner, H., Hu, J. H. et Sanny, C. G.** (1976). Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3853-5.
- Werck-Reichhart, D. et Feyereisen, R.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.*, **1**, REVIEWS3003.
- White, W. H., Skatrud, P. L., Xue, Z. et Toyn, J. H.** (2003). Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: the ALD2 and ALD3 genes are required for beta-alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **163**, 69-77.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P. et Hol, W. G.** (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.*, **187**, 101-7.

- Wu, Y., Buzzi, A., Frantseva, M., Velazquez, J. P., Cortez, M., Liu, C., Shen, L., Gibson, K. M. et Snead, O. C., 3rd** (2006). Status epilepticus in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase: GABAA receptor-mediated mechanisms. *Ann. Neurol.*, **59**, 42-52.
- Xia, M., Dempksi, R. et Hille, R.** (1999). The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3323-30.
- Yelin, R., Schyr, R. B., Kot, H., Zins, S., Frumkin, A., Pillemer, G. et Fainsod, A.** (2005). Ethanol exposure affects gene expression in the embryonic organizer and reduces retinoic acid levels. *Dev. Biol.*, **279**, 193-204.
- Yin, S. J., Chou, C. F., Lai, C. L., Lee, S. L. et Han, C. L.** (2003). Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 219-27.
- Yoon, K. A., Nakamura, Y. et Arakawa, H.** (2004). Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J. Hum. Genet.*, **49**, 134-40.
- Zhou, J. et Weiner, H.** (2000). Basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **39**, 12019-24.
- Zinovieva, R. D., Tomarev, S. I. et Piatigorsky, J.** (1993). Aldehyde dehydrogenase-derived omega-crystallins of squid and octopus. Specialization for lens expression. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11449-55.

Monsieur **PAILOT Arnaud**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en ENZYMOLOGIE MOLECULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *H° 1313*

Nancy, le *29/11/06*

Le Président de l'Université



Résumé

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDH) non-phosphorylantes à cofacteur NAD(P), coenzyme A (CoA) dépendantes ou non, forment une famille d'enzymes phylogénétiquement et structuralement distincte des ALDH phosphorylantes. Elles jouent un rôle essentiel au niveau cellulaire en intervenant notamment à différents niveaux du métabolisme cellulaire et dans des processus de détoxification. Ces enzymes catalysent la conversion d'aldéhydes en leurs acides correspondants (activés ou non par la CoA) par un mécanisme à deux étapes : une étape d'acylation incluant un processus d'oxydoréduction à transfert d'hydrure suivie d'une étape de désacylation. C'est dans ce cadre qu'une étude de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante (GAPN), de *Streptococcus mutans*, enzyme non CoA dépendante impliquée dans la production d'équivalents réducteurs nécessaires au métabolisme de la bactérie avait été entreprise. Les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la catalyse, notamment au niveau de l'étape d'acylation, et la spécificité structurale avaient été caractérisés. En particulier, le rôle essentiel des réarrangements conformationnels associés aux diverses étapes de la catalyse avait été montré.

Une approche de relation structure/fonction combinant des approches biochimiques, moléculaires et structurales a permis de montrer que le groupement β -CH₃ de la T244, résidu invariant dans les ALDH non CoA dépendantes, est essentiel au positionnement adéquat de la partie nicotinamide du cofacteur NADP au sein du complexe ternaire covalent hémithioacétal/NADP en vue de permettre un transfert d'hydrure efficace. La première structure d'un intermédiaire covalent thioacylenzyme pour l'ensemble de la famille des ALDH a également été obtenue et a permis de caractériser la conformation adoptée par le cofacteur réduit après le transfert d'hydrure. L'analyse de la structure de ce complexe covalent a permis de mettre en évidence un basculement important de la partie NMN réduite (NMNH) du cofacteur après l'étape d'acylation au niveau d'une cavité formée de résidus conservés et également retrouvée dans les autres structures connues d'ALDH non CoA dépendantes. Cette conformation de la partie NMNH est maintenant compatible avec une étape d'hydrolyse efficace. De plus, ce résultat est en accord avec le mécanisme cinétique des ALDH non CoA-dépendantes à savoir un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel le cofacteur réduit est dissocié en dernier. Ce premier volet de mon projet a été mené en collaboration étroite avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy (UMR CNRS-UHP 7036)

Le second volet de mon projet avait pour objectif l'étude de l'influence de l'environnement protéique sur le positionnement et/ou l'activation du résidu E268, dont le rôle essentiel au niveau de l'étape d'hydrolyse avait été démontré. Pour ce faire, le rôle des résidus L174, L427, et F465, conservés voire invariants dans les ALDH non CoA dépendantes, a été étudié par mutagenèse dirigée. Les substitutions L174A et F465G se révèlent drastiques puisqu'elles conduisent à un changement d'étape limitante qui devient associée à l'acylation avec une constante de vitesse k_{ac} respectivement diminuée d'un facteur 320 et 10^5 par rapport au type sauvage. Ceci s'accompagne pour le mutant L174A d'une modification de la nature de l'étape limitante au sein de l'étape d'acylation qui n'est plus associée au transfert d'hydrure mais qui le précède. L'analyse de ces résultats combinée aux données structurales disponibles suggère un rôle des résidus L174 et F465 dans le positionnement adéquat de la chaîne latérale du résidu R459 pour permettre la formation d'un complexe ternaire GAPN/NADP/G3P efficace. Il suggère également leur contribution dans le positionnement de la chaîne latérale du résidu E268 en limitant sa liberté conformationnelle, alors que la contribution du résidu L427 serait mineure.

Enfin, nous avons abordé une problématique plus générale dans le cadre des ALDH non phosphorylantes à savoir la caractérisation des facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans les phénomènes de coopérativité pouvant exister dans ces enzymes multimériques. Nous avons montré l'existence de deux populations de sous-unités non équivalentes dans la GAPN de *S. mutans*. L'étude de l'étape d'acylation en cinétique rapide montre que pour deux sous-unités la vitesse associée à cette étape est nettement supérieure à 2500 s^{-1} , alors qu'elle est de l'ordre de 800 s^{-1} pour les deux autres sous-unités. De plus, la substitution F465Y dans GAPN conduit à la perte des propriétés de coopérativité, les quatre sous-unités devenant équivalentes avec une vitesse associée à l'étape d'acylation d'environ 120 s^{-1} . L'inspection des alignements de séquences de l'ensemble des ALDH et des structures cristallines disponibles indique que ce résidu invariant est présent dans la boucle 453-467 localisée à l'interface monomère/monomère d'un même dimère. Le fait que cette boucle soit retrouvée dans toutes les structures cristallines d'ALDH non phosphorylantes suggère que l'expression des propriétés de coopérativité est liée à une conformation définie de cette boucle ou à une modification de sa conformation.

Mots clés : ALDH non phosphorylante, GAPN, stabilisation et isomérisation du cofacteur, transfert d'hydrure, site de désacylation, propriétés de coopérativité, évolution.