UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :
BIOSIGNE

Institut de Chimie des Substances Naturelles

THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Soutenue publiquement le 26 Novembre 2014 par

Aubérie PARENT

Mécanisme de Biogenèse des Centres Fe/S chez les mammifères : Rôle de la frataxine dans le contrôle de la réactivité des persulfures

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Benoît D'AUTREAUX	CR (ICSN, Gif-sur-Yvette)
Rapporteurs :	Jean-Michel CAMADRO Stéphane LEMAIRE	DR (IJM, Paris) DR (IBPC, Paris)
Examinateurs :	Victor DUARTE Béatrice PY	CR (LCBM, Grenoble) CR (IMM, Marseille)
Président du jury :	Herman VAN TILBEURGH	Professeur (IBBMC, Orsay)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Benoît D'Autréaux, qui m'a encadrée tout au long de ces trois années de thèse. Je te remercie pour ta patience, nos nombreuses discussions scientifiques et l'encadrement que tu m'as apportée me permettant de grandir et d'évoluer.

Je remercie également Jean-Claude Drapier pour son accueil au sein de son équipe à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, pour ses conseils, son enthousiasme et ses friandises que tu nous rapportais lors de chacun de tes déplacements.

Je tiens aussi à remercier chaque membre de mon jury, Jean-Michel Camadro, Victor Duarte, Stéphane Lemaire, Béatrice Py et Herman Van Tilbeurgh pour avoir accepté de juger mon travail.

J'aimerai remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer au cours de ma thèse et avec lesquelles j'ai pu collaborer et apprendre d'avantage sur d'autres disciplines que la Biochimie. Tout d'abord, merci à Anne Durand, Soufian Ouchane, Anne Soisig Steunou et l'ensemble de l'équipe de Chantal Astier du Centre de Génétique Moléculaire (GCM), pour m'avoir autorisée à utiliser votre presse de French, qui m'a été indispensable pour obtenir ma matière première : mes protéines. Je remercie aussi Véronique Henriot et Julia Jouaret, de la plateforme IMAGIF, pour leur rapidité et leur efficacité dans la confection de nos différents plasmides. Merci également à David Cornu, Manuela Argentini et Laila Sago pour l'intérêt qu'ils ont montré pour notre projet, pour leurs disponibilités et leur patience lors de l'analyse d'échantillons par spectrométrie de masse. Egalement merci aux différentes équipes de l'ICSN avec

lesquelles j'ai pu interagir ; je pense notamment à Odile Thoison, Franck Pelissier et Suzanne Ramos, du service HPLC, pour le temps qu'ils m'ont consacrée et les conseils qu'ils m'ont apportée. Un grand merci à l'équipe d'Alain Brunelle, et surtout à Jean-Pierre Le Caer, pour son implication dans notre sujet, pour l'ensemble des analyses de spectrométrie de masse, notamment sur le LTQ-Orbitrap, pour sa patience, ses conseils et ses explications. Je n'oublierai pas Anna Grandas et Xavier Elduque, de l'Université de Barcelone, pour leur précieux peptide-maléimide et cette belle collaboration entre chimistes et biochimistes. Enfin, je voudrai consacrer ses quelques lignes au CEI 2012, qui m'a permis de m'intégrer au sein de l'institut, de faire de belles rencontres et de passer d'agréables moments.

J'aimerai aussi remercier chacun des membres de l'équipe « Signalisation redox et fonctions des protéines Fe/S » pour leurs encouragements, leur gentillesse et leur soutien. Je voudrai plus particulièrement remercier :

Cendrine et Sergio, que je n'ai connu que quelques mois, mais durant lesquels ils m'ont apportée conseils et sympathie.

Sylvie, toujours présente pour m'aider dans la recherche de produits, l'élaboration de protocoles, merci pour tes conseils et tes encouragements.

Franck, merci pour ton soutien et tes conseils

Cécile, merci pour tes conseils, tes encouragements et ton intérêt scientifique aussi débordant.

Ioana et Marie-Pierre, pour l'ensemble de nos discussions, scientifiques ou privées, vos conseils et vos encouragements.

J'ai passé au sein de cette équipe trois années au cours desquelles j'ai grandi professionnellement parlant, dans laquelle j'ai été soutenue, conseillée et où j'ai pu rapidement m'intégrer. Un grand merci à TOUS.

Je terminerai par remercier mes parents, Denis et Dorothée Parent, pour leur soutien tout au long de mes études et pour m'avoir offert la possibilité de faire un métier qui me passionne. Merci Papa, merci Maman. Je n'oublie pas mon petit frère, Axel, merci mon loulou et j'espère que tu es fier de ta grande sœur ! Enfin, Merci à toi Loïc, pour ton soutien, lors de ces trois années, qui n'ont pas été de tout repos, surtout lors de ces derniers mois. Merci pour ton réconfort, chaque soir et simplement merci d'être là à mes côtés ; grâce à tes encouragements, tu m'as rendue plus forte.

Table des matières

Liste des abréviations 21
Liste des figures 27
Liste des tableaux 31
Chapitre I. Introduction bibliographique 37
A . Les centres Fer-Soufre (Fe/S) 38
A . 1 . Qu'est-ce qu'un centre Fe/S ? 38
A . 1 . 1 . Les centres [2Fe-2S] 39
A . 1 . 2 . Les centres [4Fe-4S] 39
A . 1 . 3 . Les centres [3Fe-4S] 40
A . 1 . 4 . Les centres Fe/S complexes 41
A . 2 . Quels sont leurs rôles ? 41
A . 2 . 1 . Le transfert d'électrons 41
A . 2 . 2 . La catalyse enzymatique 42
A . 2 . 3 . La régulation des gènes 44
A . 2 . 3 . 1 . La protéine IRP1 44
A . 2 . 3 . 2 . Les protéines FNR, SoxR et IscR 45
A . 2 . 4 . La réparation de l'ADN 46
B . La biogenèse des centres Fe/S 48
B . 1 . Historique 48
B . 2 . Le système ISC mitochondrial 51
B . 2 . 1 . La cystéine désulfurase, NFS1 51
B . 2 . 2 . La protéine ISD11 55
B . 2 . 3 . La protéine d'échafaudage, ISCU 56
B . 2 . 3 . 1 . Structure de la protéine ISCU 56
B . 2 . 3 . 2 . Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ 58
B . 2 . 3 . 3 . Structure du centre Fe/S d'ISCU 59
B . 2 . 3 . 4 . Mobilisation du soufre : Transfert de soufre de NFS1 vers ISCU 62
B . 2 . 4 . La ferrédoxine mitochondriale : FDX2 63
B . 2 . 5 . Modèle biogenèse des centres Fe/S 63
B . 2 . 6 . Transfert du centre Fe/S d'ISCU vers les apo-protéines cibles 65
B . 2 . 6 . 1 . Le système de chaperonne/co-chaperonne 66
B . 2 . 6 . 2 . Les transporteurs intermédiaires 68

B . 2 . 7 . Le cas particulier du système SUF 70
B . 3 . Biogenèse des centres Fe/S cytosoliques 71
B . 3 . 1 . La machinerie EXPORT, le composé X et CIA 71
B . 3 . 2 . Un domaine de controverse 72
C . La frataxine : de l'ataxie de Friedreich à la biogenèse des centres Fe/S 72
C . 1 . Les origines génétiques de l'ataxie de Friedreich 72
C . 2 . La frataxine 73
C . 2 . 1 . Localisation et maturation 73
C . 2 . 2 . Structure tridimensionnelle 74
C . 3 . Frataxine et métabolisme du fer : Quelle fonction ? 77
C . 3 . 1 . La frataxine comme protéine de stockage du fer ? 77
C . 3 . 2 . La frataxine et la biogenèse des centres Fe/S 79
C . 3 . 2 . 1 . La frataxine comme une chaperonne à fer ? 80
C . 3 . 2 . 2 . Spécificité de la frataxine pour la machinerie ISC 81
C . 3 . 2 . 2 . 1 . Deux fonctions différentes pour FXN et CyaY 82
C . 3 . 2 . 2 . 2 . La frataxine comme activateur de la formation d'ions sulfures ? 84
D . Mon projet de thèse 85
Chapitre II. Matériels et méthodes 91
A . Matériels biologiques 91
A . 1 . Système de surexpression bactérien : souche *Escherichia Coli* Rosetta2 (DE3) 91
A . 2 . Vecteurs de surexpression 91
A . 3 . Transformation des bactéries compétentes : Rosetta2 (DE3) 92
B . Production des protéines 93
B . 1 . Le milieu de culture 93
B . 2 . Surexpression des protéines 93
B . 3 . Extraction 94
B . 4 . Purification des protéines 94
B . 4 . 1 . Chromatographie d'affinité 94
B . 4 . 2 . Désalage des protéines 95
B . 4 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine 95
B . 4 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique 96
C . Dosage des protéines 97
C . 1 . Méthode de Bradford 97
C . 2 . Absorption à 280 nm 97

D . Etude de la formation des complexes ternaires et quaternaires 99
D . 1 . Etude de la formation des complexes par gel natif 99
D . 1 . 1 . Principe du gel natif 99
D . 1 . 2 . Protocole 99
D . 2 . Etude de la formation des complexes par réaction de couplage 99
D . 2 . 1 . Préparation de la solution de DST (ou DSS) 100
D . 2 . 2 . Protocole 100
D . 3 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité 100
D . 4 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'exclusion stérique 101
E . Test d'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 102
E . 1 . Cinétique de formation des persulfures 102
E . 2 . Cinétique de réduction des persulfures 103
F . Test d'activité cystéine désulfurase 103
F . 1 . Qu'est-ce qu'une cystéine désulfurase ? 103
F . 2 . Protocole du test d'activité cystéine désulfurase 104
F . 2 . 1 . Dosage du soufre 104
F . 2 . 2 . Dosage de l'alanine 105
G . Expériences de reconstitution des centres Fe/S 107
G . 1 . Suivi par UV-visible 107
G . 2 . Suivi par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 108
H . Spectrométrie de masse 108
H . 1 . Analyse des protéines entières par ESI-Q/TOF 108
H . 2 . Analyse des peptides par LTQ-Orbitrap XL 109
I . Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) 110
I . 1 . AccQ-Fluo Reagent Kit 110
I . 2 . Protocole 111
J . Dosage du soufre dans la protéine NSP5 111
Chapitre III. Purification des protéines et étude de la formation des complexes de la machinerie ISC 117
A . Purification des protéines 117
A . 1 . Obtention des plasmides et surexpression des protéines 117
A . 2 . Purification des protéines 119
A . 2 . 1 . Purification de NFS1 et du complexe NFS1-ISD11 119
A . 2 . 1 . 1 . Analyse des extraits bruts 119

A . 2 . 1 . 2 . Chromatographie d'affinité 121
A . 2 . 1 . 3 . Test de clivage par la thrombine 122
A . 2 . 1 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique 123
A . 2 . 1 . 5 . Identification de la modification de NFS1 par LTQ-Orbitrap XL 125
A . 2 . 1 . 5 . 1 . Principe du LTQ-Orbitrap XL 125
A . 2 . 1 . 5 . 2 . Exploitation des résultats 126
A . 2 . 2 . Purification de la protéine ISCU 129
A . 2 . 2 . 1 . Analyse des extraits bruts 129
A . 2 . 2 . 2 . Chromatographie d'affinité 129
A . 2 . 2 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU par la thrombine 130
A . 2 . 2 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique 132
A . 2 . 3 . Purification de la protéine FXN 133
A . 2 . 3 . 1 . Analyse des extraits bruts 133
A . 2 . 3 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine de FXN par la thrombine 135
A . 2 . 3 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique 136
A . 2 . 4 . Purification des protéines FDX2 et GLRX5 137

B . Etude de la formation des complexes entre les protéines NFS1, ISD11, ISCU et FXN 138

B . 1 . Etude de la formation des complexes par électrophorèse en conditions non dénaturantes .. 139
B . 2 . Etude de la formation des complexes par réaction de crosslink 142
B . 2 . 1 . Le choix du crosslinker 142
B . 2 . 2 . Réaction de couplage 143
B . 3 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité 145
B . 3 . 1 . Influence de l'imidazole dans l'interaction entre FXN et NIU 147
B . 3 . 2 . Influence du fer et de la L-cystéine dans la formation du complexe NIUF 147
B . 4 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'exclusion stérique 148
B . 4 . 1 . Analyse du complexe NIU 149
B . 4 . 2 . Analyse du complexe NIUF 150
B . 4 . 3 . Analyse du complexe NIF 151
B . 5 . Détermination de la stœchiométrie des complexes par mesure de l'activité cystéine désulfurase 152
B . 6 . Formation des complexes ternaires et quaternaires avec les mutants d'ISCU et de FXN 154

C . Discussion - Conclusion 158

Chapitre IV. Etude des effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11 167

A . Etude des effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11 par mesure de l'activité cystéine désulfurase 167

B . Etude de la formation du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU 171

B . 1 . Etude de la formation du persulfure de NFS1 par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$. 171

B . 1 . 1 . Principe du test de détection des persulfures par l'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 171

B . 1 . 2 . Utilisation du test d'alkylation au $MalP_{16}$ pour l'étude des cinétiques de formation du persulfure de NFS1 175

B . 1 . 3 . Effet de la protéine ISCU sur la cinétique de formation du persulfure de NFS1 175

B . 2 . Etude de la formation du persulfure de NFS1 par spectrométrie de masse en protéine entière 177

C . Etude du transfert de soufre de NFS1 vers ISCU 180

C . 1 . Etude du transfert de soufre par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 181

C . 1 . 1 . Analyse de la protéine ISCU par alkylation avec le $MalP_{16}$ 181

C . 1 . 2 . Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 181

C . 1 . 3 . Mécanisme de transfert 184

C . 2 . Analyse du transfert de soufre par spectrométrie de masse en protéine entière 185

D . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU 186

D . 1 . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU par LTQ-Orbitrap XL 186

D . 2 . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU avec les mutants C35S, C61S et C104S d'ISCU 188

E . Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU 190

F . Etude de la réduction du persulfure d'ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ 192

G . Analyse de l'activité cystéine désulfurase en cycle multiple 194

G . 1 . Identification de l'étape limitante 194

G . 2 . Mécanisme de réduction 195

G . 3 . Etude des mutants C104S et C104G d'ISCU 198

H . Discussion – Conclusion 199

Chapitre V. Etude des effets de la protéine FXN sur les complexes NFS1-ISD11 et NFS1-ISD11-ISCU 209

A . Effets de la protéine FXN sur la formation et la réduction des persulfures dans le complexe NFS1-ISD11-ISCU 209

A . 1 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1 210

A . 1 . 1 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1 étudiés par alkylation des protéine avec le $MalP_{16}$ 210

A . 1 . 2 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1 étudiés par spectrométrie de masse en protéine entière 212

A . 1 . 3 . Effet de la concentration en complexe et en L-cystéine sur la formation du persulfure de NFS1 en présence de FXN 213

B . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre de NFS1 vers ISCU 215

B . 1 . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre étudiés par alkylation au $MalP_{16}$ 215

B . 2 . Effets de le protéine FXN sur le transfert de soufre étudiés par spectrométrie de masse en protéine entière 217

B . 3 . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre entre NFS1 et les mutants C35S et C104S d'ISCU 219

C . Etude des effets de la protéine FXN sur les réactions de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU 220

C . 1 . Effet de la protéine FXN sur la réduction du persulfure de NFS1 220

C . 2 . Effets de la protéine FXN sur la réduction du persulfure d'ISCU 222

D . Etude de la réduction du persulfure de NFS1 par mesure de l'activité cystéine désulfurase en cycle multiple 223

E . Etude du mécanisme d'activation par la frataxine 225

E . 1 . Spécificité de la réduction par les réducteurs externes 225

E . 2 . Etude des activités persulfure réductase de FDX2 et GLRX5 227

E . 3 . Etude du mutant R162A de FXN 228

F . Etude du mutant M106I d'ISCU : un homologue fonctionnel de FXN ? 230

F . 1 . Etude de la réduction du persulfure de NFS1 230

F . 2 . Etude du transfert de soufre entre NFS1 et $ISCU^{M106I}$ 231

F . 3 . Etude de la vitesse de réduction du persulfure d'$ISCU^{M106I}$ 232

G . Discussion - Conclusion 233

Chapitre VI. Etudes des mécanismes de formation d'un centre Fe/S sur la protéine ISCU 241

A . Reconstitution d'un centre Fe/S *in vitro* sur la protéine ISCU 241

A . 1 . Reconstitution Fe/S en présence de DTT 241
A . 2 . Reconstitution Fe/S avec la L-cystéine comme réducteur 244
A . 3 . Etude du mutant M106I d'ISCU 246
B . Discussion - Conclusion 247
Chapitre VII. Conclusion Générale 253
Références Bibliographiques 261
Annexe 1. Comparaison des alignements des séquences codantes de NFS1 de souris (séquence 1) et du plasmide pCDFDuet NFS1-ISD11 (séquence 2) 281
Annexe 2. Séquence protéique de NFS1 286
Annexe 3. Séquence protéique d'ISD11 287
Annexe 4. Séquences protéiques d'ISCU WT et ses mutants C35S, C61S, C104S, C104G et M106I 288
Annexe 5. Séquences Protéiques de FXN WT et son mutant R162A 290
Annexe 6. Principe de la presse de French 292
Annexe 7. Principe de la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel 293
Annexe 8. Principe de la colonne Superdex (75 ou 200) 294
Annexe 9. Structure du site de clivage reconnu par la thrombine 295
Annexe 10. Composition des gels et des tampons pour l'électrophorèse en conditions non-dénaturantes (gel natif) 296
Annexe 11. Composition des gels et des tampons pour l'électrophorèse SDS-PAGE 297
Annexe 12. Composition des gels et des tampons pour le Western Blot 298
Annexe 13. Principe du spectromètre de masse ESI-Q/TOF 299
Annexe 14. Principe de fonctionnement du LTQ-Orbitrap 302
Annexe 15. Identification de la cystéine persulfurée de NFS1 dans le complexe NIUF 303
Annexe 16. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIU 305
Annexe 17. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIU 306
Annexe 18. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF 308
Annexe 19. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF 309
Annexe 20. Constante de vitesse, k_{R1}, de réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine 311

Liste des abréviations

ABCB7	ATP-binding cassette B7
ADH	Alanine déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ado•	Radical 5'-deoxyadenosyl
ADP	Adenosine diphosphate
A. fulgidus	Archeoglobus fulgidus
ALR	Augmenter of liver regeneration
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
A. vinelandii	Azotobacter vinelandii
BAG	Boîte à gant
BER	Base excision repair
BSA	Bovine serum albumine
B. subtilis	Bacillus subtilis
Cam	Carbamidométhylation
CFD1	Cytosolic Fe/S cluster deficient 1
CIA	Cytosolic iron-sulfur cluster Assembly
CSD	Cysteine sulfinate desulfurase
CyaY	homologue bactérien de frataxine
Da	Dalton
DMPD	Diméthyl phénylène diamine
DO	Densité optique
DSS	Disuccinimidyl sulerate (crosslinker)
DST	Disuccinimidyl tartrate (crosslinker)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediamnietetraacic acid
EndoIII	Endonucléase III
ESI	Electron spray ionisation
FDX2	Ferrédoxine 2 (mammifères)
Fe/S	Fer-soufre (centre)
FNR	Fumarate and Nitrate reduction
FRDA	Friedreich ataxia
FXN (F)	Frataxine
GLRX5	Glutarédoxine 5 (mammifères)
Grx5	Glutarédoxine 5 (levure)

GSH	Glutathion
H. influenza	Haemophilus influenza
HscA	Heat shock cognate A
HscB	Heat shock cognate B
HSPA9	Heat shock protein 70 kDa 9
Hsp20	Heat shock protein 20 kDa
Hsp70	Heat shock protein 70 kDa
IAA	Iodoacétamide
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
IRE	Iron-responsive element
IRP1	Iron regulatory protein 1
ISC	Iron-sulfur cluster
ISCU (U)	Iron-sulfur cluster U-type protein (mammifères)
IscU	Iron-sulfur cluster U-type protein (procaryotes)
ISD11 (I)	Iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein 11 (mammifères)
Isd11	Iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein 11 (levure)
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LTQ-Orbitrap	Linear ion trap quadripole-Orbitrap
$MalP_{16}$	Maléimide peptide 16
MBS	M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (crosslinker)
mL	Millilitre
µL	Microlitre
mM	Millimolaire (ou millimoles par litre ($mmol.L^{-1}$)
µM	Micromolaire (ou micromoles par litre ($\mu mol.L^{-1}$)
nM	Nanomolaire (ou nanomoles par litre ($nmol.L^{-1}$)
MOPS	3-N-morpholinopropane sulfonic acid
MTTase	Méthylthiotransférase
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
MSCC	Succinimidyl-4-[N-maléimidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate (crosslinker)
MW	Molecular weight
MWCO	Molecular weight cut-off
$NAD(P)^+$/NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucleotide (phosphate) oxydé/réduit
NFS1 (N)	Nitrogen fixation 1 homolog (mammifères)
Nfs1	Nitrogen fixation 1 homolog (levures)
NI	Complexe NFS1-ISD11
NIF	Nitrogen fixation
NIF	Complexe NFS1-ISD11-FXN

NIU	Complexe NFS1-ISD11-ISCU
NIUF	Complexe NFS1-ISD11-ISCU-FXN
PDB	Protein data bank
PLP	Pyridoxal-5'-posphate
P. viridiflava	Pseudomonas viridiflava
Q	Quadripôle (spectrométrie de masse)
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
rpm	Rotation par minute
SAM	S-adénosylméthionine
S. cerevisiae	Saccharomyces serevisiae
SDB	Substrat binding domain
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S. flexneri	Shigella flexneri
SOD	Superoxyde dismutase
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes
SUF	Sulfur mobilization
Tampon A	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8
Tampon B	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8
Tampon C	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8
Tampon D	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 100 mM Imidazole, pH 8
Tampon E	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 800 µM Imidazole, pH 8
Tampon F	Composé de 50 mM de Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
T. maritima	Thermatoga maritime
TOF	Time of fly (spectrométrie de masse)
5'-UTR	5'-Untranslated region
UV	Ultra-violet
XLSA/A	X-linked sideroblastic anemia and ataxia
Yfh1	Yeast frataxin homolog 1
°C	Degré Celsius

Liste des figures

Figure I. 1. Structure du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.. 42
Figure I. 2. Schéma du cycle catalytique de l'aconitase mitochondriale.. 43
Figure I. 3. Les protéines à radical-SAM.. 43
Figure I. 4. Schéma du principe de fonctionnement de la protéine IRP1. 45
Figure I. 5. Schéma du principe de fonctionnement des BER glycosylases. 47
Figure I. 6. Alignement de séquences protéiques des cystéines désulfurases. 52
Figure I. 7. Structures cristallographiques des cystéines désulfurases NifS et IscS de différents organismes.. 53
Figure I. 8. Visualisation des domaines d'IscS (Figure I. 7) et du site de fixation du PLP.. .. 53
Figure I. 9. Schéma du cycle catalytique réalisé par les cystéines désulfurases. 55
Figure I. 10. Structures d'IscU de chez *Haemophilus influenza* et *Escherichia coli* obtenues par RMN. 57
Figure I. 11. Structures des complexes $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*Echérichia coli* et *Archaeoglobus fulgidus*, obtenues par cristallogenèse 58
Figure I. 12. Structures des protéines IscU *Haemophilus influenza* et *Streptococcus pyogenes* ayant incorporé un atome de zinc. 59
Figure I. 13. Alignement des séquences protéiques correspondant aux protéines NifU, IscU et ISCU.. 60
Figure I. 14. Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ d *Archaeoglobus fulgidus* obtenue par cristallogenèse. 61
Figure I. 15. Schéma d'organisation de la biogenèse des centres Fe/S. 64
Figure I. 16. Schéma du mécanisme séquentiel de transfert du centre Fe/S avec le système HscA/HscB.. 67
Figure I. 17. Schéma représentatif de la biogenèse des centres Fe/S chez les mammifères.. . 69
Figure I. 18. Structures des protéines frataxines eucaryotes et procaryotes. 74
Figure I. 19. Distribution des charges sur la surface de la protéine FXN (*Homo sapiens*)..... 75
Figure I. 20. Localisation des mutants FRDA de la FXN.. 76
Figure I. 21. Les oligomères d'Yfh1 (*S. cerevisiae*).. 78
Figure I. 22. Structure du complexe IscS-IscU-CyaY.. 82

Figure II. 1. Principe de fonctionnement des cystéines désulfurases..... 103
Figure II. 2. Principe du dosage des ions sulfures produit au cours du test d'activité cystéine désulfurase. 104
Figure II. 3. Principe de fonctionnement de l'alanine déshydrogénase (ADH). 105
Figure II. 4. Courbe expérimentale de l'analyse d'un échantillon grâce à l'ADH. 106
Figure II. 5. Principe de la dérivatisation des amines primaires et secondaires par l'AQC.. 110

Figure III. 1. Alignement des séquences en N-terminal des cystéines désulfurases procaryotes et eucaryotes. 118
Figure III. 2. Extraction de la protéine NFS1 (33-459). 119
Figure III. 3. Surexpression et extraction des protéines NFS1 et ISD11. 120
Figure III. 4. Purification du complexe NFS1-ISD11 par chromatographie d'affinité. 121
Figure III. 5. Test de clivage de l'étiquette poly-histidine de NFS1. 122
Figure III. 6. Purification du complexe NFS1-ISD11 par chromatographie d'exclusion de taille.. 123
Figure III. 7. Etat de pureté du complexe NFS1-ISD11. 124
Figure III. 8. Spectre de masse ESI-Q/TOF du complexe NI. 125
Figure III. 9. Analyse ORBITRAP-MS/MS du peptide GHHHHHHSQLVPR. 127
Figure III. 10. Surexpression et extraction de la protéine ISCU. 129
Figure III. 11. Purification de la protéine ISCU par chromatographie d'affinité. 130
Figure III. 12. Test de Clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU.. 131
Figure III. 13. Purification de la protéine ISCU par chromatographie d'exclusion de taille. 132
Figure III. 14. Surexpression et extraction de la protéine FXN. 134
Figure III. 15. Purification de la protéine FXN par chromatographie d'affinité. 135
Figure III. 16. Test de clivage de l'étiquette poly-histidine de la protéine FXN. 136
Figure III. 17. Purification de la protéine FXN sur la colonne Superdex 75. 136
Figure III. 18. Purification de la protéine FDX2 par chromatographie d'exclusion de taille et caractérisation par UV-visible. 137
Figure III. 19. Purification de la protéine GLRX5 par chromatographie d'exclusion de taille. 138
Figure III. 20. Analyse de la formation des complexes par gel natif. 140
Figure III. 21. Structures des quatre crosslinkers utilisés pour l'étude de la formation des complexes. 142
Figure III. 22. Etude de la formation des complexes avec différents crosslinkers. 144
Figure III. 23. Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité. 145
Figure III. 24. Identification des protéines ISCU et FXN par western blot après analyse sur la colonne de nickel. 146
Figure III. 25. Profil d'élution des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique du complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et des protéines ISCU et FXN (20 µM). 149
Figure III. 26. Caractérisation du complexe NIU.. 149
Figure III. 27. Caractérisation du complexe NIUF. 150
Figure III. 28. Caractérisation du complexe NIF.. 151
Figure III. 29. Détermination de la stœchiométrie du complexe NIU. 152
Figure III. 30. Détermination de la stœchiométrie du complexe NIUF. 153
Figure III. 31. Détermination de la stœchiométrie du mélange NI + F.. 153

Figure III. 32. Caractérisation du complexe NIU^{C35S}. 154
Figure III. 33. Caractérisation du complexe NIU^{C104S}. 154
Figure III. 34. Caractérisation du complexe NIU^{C61S}. 155
Figure III. 35. Vitesses initiales mesurées par les activités cystéine désulfurase des complexes NIU, NIU^{C104S}, NIU^{C104G} et NIU^{M106I}. 156
Figure III. 36. Caractérisation du complexe NIUF avec les mutants C35S et C104S d'ISCU. 157

Figure IV. 1. Schéma des réactions de formation et de réduction du persulfure de la protéine NFS1..... 168
Figure IV. 2. Activité cystéine désulfurase des complexes NI et NIU. 169
Figure IV. 3. Evolution de la quantité de soufre d'une solution de Na_2S à pH 10 et à pH 8.. 170
Figure IV. 4. Principe du test de détection des persulfures par alkylation des protéines avec le MalP.. 172
Figure IV. 5. Structures des Maléimides-Peptides testés.. 173
Figure IV. 6. Principe du test d'alkylation avec le $MalP_{16}$.. 174
Figure IV. 7. Formation du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU. 175
Figure IV. 8. Quantification des gels SDS-PAGE de la Figure IV. 7, B. 176
Figure IV. 9. Spectres de masse ESI-Q/TOF des complexes NI et NIU..... 178
Figure IV. 10. Principe d'alkylation de la protéine ISCU par le $MalP_{16}$. 181
Figure IV. 11. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$. 182
Figure IV. 12. Quantification des gels SDS-PAGE de la Figure IV. 11, B. 183
Figure IV. 13. Mise en évidence d'un transfert de soufre direct entre NFS1 et ISCU.. 184
Figure IV. 14. Analyse du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par spectrométrie de masse en protéine entière. 185
Figure IV. 15. Séquence de la protéine ISCU de souris..... 187
Figure IV. 16. Cinétique de formation du persulfure d'$ISCU^{C35S}$.. 188
Figure IV. 17. Cinétique de formation du persulfure d'$ISCU^{C104S}$.. 189
Figure IV. 18. Réduction du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU. 190
Figure IV. 19. Cinétique de réduction du persulfure d'ISCU, du complexe NIU, par le DTT. 192
Figure IV. 20. Formation de l'alanine par les complexes NI et NIU en fonction du temps. 194
Figure IV. 21. Mesure de l'alanine après 10 secondes de réaction pour différentes concentrations du complexe NFS1-ISD11.. 195
Figure IV. 22. Etude de la réduction des persulfures des complexes NI et NIU par la L-cystéine.. 196
Figure IV. 23. Diagramme des vitesses initiales obtenues pour chacun des complexes NI, NIU, NIU^{C104S} et NIU^{C104G}. 198
Figure IV. 24. Mécanisme séquentiel de formation et de réduction des persulfures du complexe NIU. 202

Figure V. 1. Activité cystéine désulfurase du mélange NI+F et du complexe NIUF. 210
Figure V. 2. Etude de la formation du persulfure de NFS1 dans le mélange NI+F et le complexe NIUF. 211
Figure V. 3. Spectres de masse ESI-Q/TOF reconstitués des complexes NI (B), NIU (C) et NIUF (E) et du mélange NI+F (D) 212
Figure V. 4. Etude de la formation du persulfure de NFS1 à 50nM, en présence ou non de FXN. 214
Figure V. 5. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans le complexe NIUF. 215
Figure V. 6. Etude de la réaction de transfert entre NFS1 et ISCU dans le complexe NIUF. 216
Figure V. 7. Spectres de masse ESI-Q/TOF reconstitués du complexe NIUF en absence (A) ou en présence (B) de L-cystéine.. 217
Figure V. 8. Cinétique de formation du persulfure d'ISCU dans les complexes quaternaires avec les mutants C35S et C104S d'ISCU. 219
Figure V. 9. Vitesses initiales mesurées par les activités cystéine désulfurase des complexes NIU, NIU^{C104S}, NIU^{C104G} en présence ou non de frataxine.. 220
Figure V. 10. Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans le mélange NI+F et le complexe NIUF.. 221
Figure V. 11. Etude de la réduction du persulfure d'ISCU dans le complexe NIUF. 222
Figure V. 12. Alanine produite au cours du temps pour le mélange NI+F et le complexe NIUF. 223
Figure V. 13. Réduction du persulfure de NFS1 du complexe NIUF par le L-cystéine.. 225
Figure V. 14. Comparaison des constantes de vitesse k_{R1} déterminées pour les complexes NIU et NIUF, incubés avec différents réducteurs.. 226
Figure V. 15. Réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU par les protéines FDX2 et GLRX5. 228
Figure V. 16. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans le complexe $NIUF^{R162A}$.. 229
Figure V. 17. Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans le complexe NIU^{M106I}. 230
Figure V. 18. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans les complexes NIU^{M106I} et $NIU^{M106I}F$. 231
Figure V. 19. Etude de la réduction du persulfure d'ISCU dans le complexe NIU^{M106I}. 232
Figure V. 20. Schéma proposé du mécanisme d'action de la frataxine sur le complexe NIU.. 234

Figure VI. 1. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en présence de DTT, suivi par UV-visible 242
Figure VI. 2. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en présence de DTT, suivi par alkylation au $MalP_{16}$ 243
Figure VI. 3. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en absence de DTT, suivi par UV-visible 244

Figure VI. 4. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUf, en absence de DTT, suivi par alkylation au $MalP_{16}$ 245
Figure VI. 5. Effet du mutant M106I d'ISCU au cours de la reconstitution des centres Fe/S. 247

Liste des tableaux

Tableau I. 1. Structures et propriétés des centres [2Fe-2S], [4Fe-4S] et [3Fe-4S]. 40
Tableau I. 2. Récapitulatif des protéines eucaryotes impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S et leurs homologues chez la levure et la bactérie. 50

Tableau II. 1. Résumé de l'ensemble des plasmides utilisés au cours de ma thèse. 92
Tableau II. 2. Coefficients d'extinction molaire de chacune des protéines étudiées au cours de ma thèse et leurs références. 98
Tableau II. 3. Récapitulatif du gradient suivi au cours des analyses d'échantillons par HPLC. 111

Tableau III. 1. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide GHHHHHHSQLVPR 128

Tableau IV. 1. Résumé des résultats obtenus après analyse de la digestion tryptique de NFS1 par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL.. 179
Tableau IV. 2. Résumé des résultats obtenus après analyse des peptides des protéines NFS1, ISD11 et ISCU sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL 187
Tableau IV. 3. Récapitulatif des constantes de vitesse déterminées. 193

Tableau V. 1. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF.. .. 217
Tableau V. 2. Résumé des constantes de vitesse calculées. 223
Tableau V. 3. Résumé des constantes de vitesse k_{R1} déterminées pour le complexe NIUF, pour différents réducteurs 227

Chapitre I

Introduction bibliographique

Chapitre I. Introduction bibliographique

Les métalloprotéines appartiennent à un grand groupe de protéines ayant incorporées un métal au sein de leurs structures. Ce cofacteur permet à ces métalloprotéines d'acquérir soit une conformation particulière, soit une activité catalytique. Les métaux les plus fréquemment rencontrés en biologie sont le cuivre, le zinc, le manganèse et surtout le fer. Les atomes de fer peuvent être incorporés au sein d'une protéine soit sous forme hémique ou non-hémique, soit sous la forme d'un édifice appelé centre « Fer-Soufre » (Fe/S).

Il a été proposé que la vie sur Terre soit apparue à la surface de pierres de pyrite (FeS_2) (Wachtershauser 1988). Ces pierres, composées de fer et de soufre, sont considérées aujourd'hui comme de possibles précurseurs des centres Fe/S. Ces édifices sont d'ailleurs présents chez tous les organismes, de la bactérie jusqu'aux mammifères. Les centres Fe/S sont des constituants essentiels pour le bon fonctionnement d'une cellule, puisqu'un déficit de centres Fe/S entraine des maladies graves notamment neurodégénératives et cardiaques. Cependant, bien qu'il soit possible *in vitro* de reconstituer un centre Fe/S au sein d'une protéine à partir de solutions de fer et de soufre inorganique ; *in vivo*, la synthèse des centres Fe/S nécessite une ou plusieurs machineries multi-protéiques. Un certain nombre de composants des machineries d'assemblage des centres Fe/S découvertes chez les mammifères présentent de fortes homologies avec les systèmes bactériens, ce qui suggère un degré important de conservation des mécanismes de biogenèse des centres Fe/S au cours de l'évolution. Mon sujet de thèse a été essentiellement axé sur les mécanismes de biogenèse de ces centres Fe/S chez les mammifères. La première partie de cette introduction sera consacrée à la fonction de ces centres Fe/S. Dans la seconde partie, nous aborderons la description des mécanismes de biosynthèse des centres Fe/S chez les mammifères ; où les similitudes avec les systèmes bactériens seront mises en avant. Enfin, mon travail de recherche a été principalement consacré à une petite protéine mitochondriale, la frataxine, impliquée dans les premières étapes de la biogenèse des centres Fe/S. Un défaut de synthèse de la frataxine est à l'origine de l'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative. Depuis cette découverte dans les années 90, et malgré de nombreux travaux pour tenter de comprendre sa fonction, le rôle de la frataxine est encore mal connu et controversé, ce qui limite probablement le développement de traitement pour lutter contre cette maladie. L'ensemble des études réalisées sur cette protéine seront présentées dans la troisième et dernière partie de cette introduction.

A . Les centres Fer-Soufre (Fe/S)

A . 1 . Qu'est-ce qu'un centre Fe/S ?

Les centres Fe/S ont été découverts dans les années 60 (Beinert *et al.* 1960; Sands *et al.* 1960; Shethna *et al.* 1964; Zeylemaker *et al.* 1965; DerVartanian *et al.* 1967; Shethna *et al.* 1968) et suscitent depuis un très grand intérêt. Ce sont de petits groupements prosthétiques, composés d'atomes de fer et de soufre inorganique (S^{2-}). Au sein de la protéine, les atomes de fer du centre Fe/S sont coordonnés majoritairement par les groupements thiols des résidus cystéines. Toutefois, des ligands de natures différentes peuvent intervenir. Par exemple, on retrouve, les atomes d'azote des résidus arginines (Berkovitch *et al.* 2004) et histidines (Lin *et al.* 2007), comme pour la protéine de Rieske (Iwata *et al.* 1996) ou les protéines à motifs « CDGSH » (Lin *et al.* 2011), avec la protéine mitoNEET qui est étudiée au laboratoire (Ferecatu *et al.* 2014). Les atomes d'oxygène appartenant aux résidus sérines (Brereton *et al.* 1999), aspartates (Calzolai *et al.* 1995) et glutamines (Dobritzsch *et al.* 2001) peuvent également lier l'atome de fer du centre Fe/S. Il a été observé que les atomes de fer des centres Fe/S pouvaient aussi être reliés à des ligands exogènes. Ces ligands peuvent être le substrat de l'enzyme, un cofacteur ou encore une molécule d'eau (Lauble *et al.* 1992; Berkovitch *et al.* 2004).

Les centres Fe/S incorporés au sein des protéines sont présents sous plusieurs états rédox caractérisés par un potentiel rédox qui dépend de la nature des ligands du centre Fe/S, de son environnement protéique et de sa géométrie. A l'heure actuelle, l'ensemble des protéines à centre Fe/S découvertes (notées protéines Fe/S par la suite) englobe la quasi-totalité de l'échelle des potentiels rédox des réactions du vivant (-800 mV à 800mV) ; permettant aux protéines Fe/S d'être impliquées dans des mécanismes biologiques fondamentaux aussi divers et variés que la respiration mitochondriale, la régulation de l'expression des gènes et la catalyse de réactions chimiques.

Malgré un grand nombre de protéines Fe/S connues, aucun motif de séquence universel à toutes ces protéines, n'a été identifié. C'est pourquoi, à partir d'une séquence d'acides aminés, il est difficile de prédire si une protéine peut contenir un centre Fe/S. Cependant, il existe des motifs de séquence conservés, comme le motif « $CX_4CX_2CX_{30}C$ »

(où C correspond à une cystéine et X, un acide aminé quelconque), pour les centres [2Fe-2S] des ferrédoxines de mammifère et de plante ; ou encore le motif « $CX_2CX_2CX_{20-40}C$ », pour les centres [4Fe-4S] caractérisés notamment chez les ferrédoxines [4Fe-4S] (Xu *et al.* 2011).

Les centres Fe/S existent sous plusieurs formes que nous allons décrire plus en détails ci-dessous.

A . 1 . 1 . Les centres [2Fe-2S]

Les centres [2Fe-2S] sont composés de deux atomes de fer, présents soit sous forme ferrique (Fe^{3+}) ou ferreuse (Fe^{2+}) et de deux atomes de soufre inorganique (S^{2-}), organisés dans une géométrie tétraédrique rhombique (**Tableau I. 1**). Les atomes de fer sont reliés à la fois par les deux atomes de soufre et par deux autres ligands appartenant à la chaîne polypeptidique de la protéine. Les centres [2Fe-2S] existent sous deux états rédox : 1) un état oxydé, $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$, où les deux atomes de fer sont sous une forme ferrique et 2) un état réduit, $[2Fe\text{-}2S]^{+}$, où un des atomes de fer est sous une forme ferrique, l'autre est ferreux.

A . 1 . 2 . Les centres [4Fe-4S]

Les centres [4Fe-4S] sont composés de quatre atomes de fer et de quatre atomes de soufre inorganique organisés dans une géométrie cubique (**Tableau I. 1**). Chaque sommet du cube est occupé alternativement par un atome de fer puis un atome de soufre. Les centres [4Fe-4S] existent sous trois états rédox différents qui déterminent deux couples rédox différents : $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ / $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ et $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ / $[4Fe\text{-}4S]^{+}$; correspondant à deux familles de protéines [4Fe-4S], les HiPiPs (high potential iron-sulfur proteins) et les autres protéines [4Fe-4S] aux potentiels plus bas.

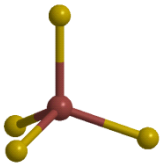
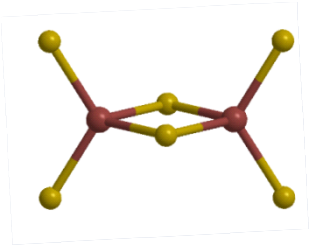
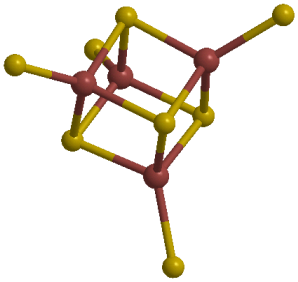
Nom	Structure	Etats rédox	Potentiels rédox par rapport à l'ENH (pH7)
[1Fe]		Fe^{2+} Fe^{3+}	- 100 mV à + 20 mV
[2Fe-2S]		$[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ $[2Fe\text{-}2S]^{+}$	- 400mV à + 300 mV
[4Fe-4S]		$[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ $[4Fe\text{-}4S]^{+}$	- 800 mV à - 100 mV **HiPiP** : + 50 mV à + 450 mV

Tableau I. 1. Structures et propriétés des centres [2Fe-2S], [4Fe-4S] et [3Fe-4S].

A . 1 . 3 . Les centres [3Fe-4S]

Les centres [3Fe-4S] sont composés de trois atomes de fer et quatre atomes de soufre inorganique (**Tableau I. 1**). Ils existent sous deux états rédox : $[3Fe\text{-}4S]^{+}$ et $[3Fe\text{-}4S]^{0}$. Bien que les centres [3Fe-4S] puissent être des cofacteurs actifs, ils sont généralement la résultante de la dégradation oxydative d'un centre [4Fe-4S]. Dans ce cas, les centres [3Fe-4S] inactifs peuvent être régénérés en centres [4Fe-4S] en présence de Fe^{2+} (Bulteau *et al.* 2004).

A . 1 . 4 . Les centres Fe/S complexes

Des centres Fe/S encore plus complexes ont été caractérisés dans certaines protéines. Ils ont la particularité de contenir plus de 4 atomes de fer ou encore d'être reliés à d'autres métaux tels que le nickel ou le molybdène. C'est le cas, par exemple, de la nitrogénase. Cette protéine comporte, entre autre, un centre [Mo-7Fe-9S] et un centre [8Fe-7S], nommés respectivement centre MoFe et centre P (Georgiadis *et al.* 1992; Mayer *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2005; Xu *et al.* 2011).

Enfin, il est intéressant de souligner que la plupart des centres Fe/S identifiés sont des centres [4Fe-4S] et [2Fe-2S] ; et qu'il n'est pas rare de rencontrer des protéines ayant incorporées plus d'un centre Fe/S, comme par exemple, les hydrogénases avec 3 centres [4Fe-4S].

A . 2 . Quels sont leurs rôles ?

A . 2 . 1 . Le transfert d'électrons

Le transfert d'électrons est le premier rôle attribué aux centres Fe/S. Ce transfert d'électrons est possible grâce à la capacité des atomes de fer des centres Fe/S à passer d'un état oxydé (Fe^{3+}) à un état réduit (Fe^{2+}) et vis-et-versa. Ainsi, les centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] sont capables d'accepter ou de recevoir un seul électron à la fois. Le centre [8Fe-7S] de la nitrogénase, dans une géométrie double-cubique, est le seul exemple de transfert à deux électrons, avec deux potentiels rédox très proches des couples $[8Fe\text{-}7S]^{2+}$ / $[8Fe\text{-}7S]^{+}$ et $[8Fe\text{-}7S]^{+}$ / $[8Fe\text{-}7S]^{0}$ (Peters *et al.* 1997; Lanzilotta *et al.* 1998; Johnson *et al.* 2005). Enfin, ces transferts peuvent être intramoléculaires, c'est-à-dire au sein d'une même protéine, ou bien intermoléculaires, entre deux ou plusieurs composantes protéiques.

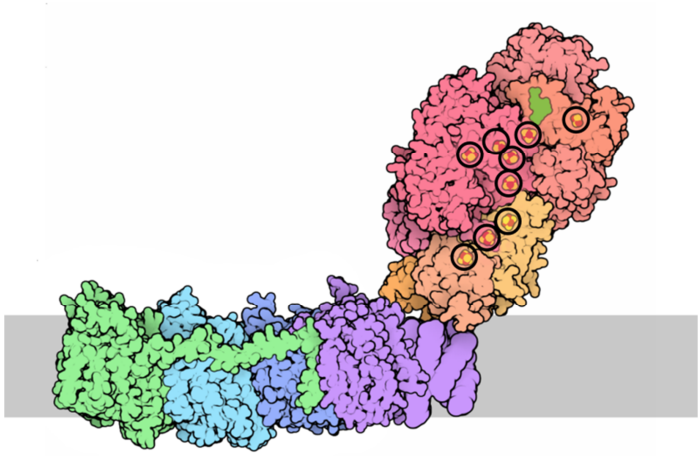


Figure I. 1. Structure du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les 9 centres Fe/S, nécessaires au transfert d'électrons, sont encerclés en noir (image : David S. Goodsell and RCSB PDB).

Par exemple, de nombreux centres Fe/S sont impliqués dans la respiration mitochondriale pour le transport d'électrons (**Figure I. 1**). Le complexe I, aussi appelé NADH-ubiquinone oxydoréductase, comporte pas moins de 9 centres Fe/S au total, soit 2 centres [2Fe-2S] et 7 centres [4Fe-4S].

A . 2 . 2 . La catalyse enzymatique

Certaines protéines utilisent leurs centres Fe/S afin de catalyser des réactions chimiques. C'est le cas, par exemple, de l'aconitase mitochondriale. Cette enzyme, intervenant dans le cycle de Krebs, est capable de réaliser une isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate (**Figure I. 2**). Cette réaction est catalysée par le centre [4Fe-4S] incorporé dans l'aconitase mitochondriale ; où l'un des atomes de fer joue un rôle d'acide de Lewis. Cet atome de fer possède un ligand labile, généralement une molécule d'eau, et lorsque le substrat (citrate) entre dans le site catalytique, la molécule d'eau est échangée au profit de la formation d'une liaison citrate-fer (Lauble *et al.* 1992; Lauble *et al.* 1994).

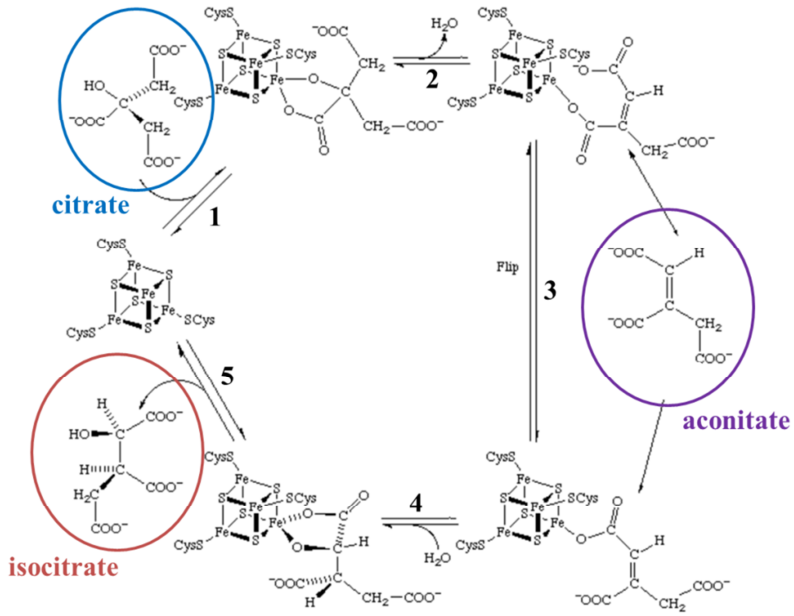


Figure I. 2. Schéma du cycle catalytique de l'aconitase mitochondriale. Le mécanisme d'isomérisation du citrate en isocitrate par l'aconitase mitochondriale commence par l'entrée du citrate dans le site actif (**1**). Une déshydratation conduit à la formation d'une double liaison carbone-carbone (**2**), suivi d'un changement de coordination de l'atome de fer (**3**). Une hydratation permet de recouvrir une simple liaison carbone-carbone (**4**) conduisant à l'isocitrate (**5**). Image inspirée de (Lauble *et al.* 1994) et provenant de http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/aconit2.html .

Les protéines de la famille des « radical-SAM » (S-AdénosylMethionine) sont également des protéines utilisant leurs centres [4Fe-4S] comme catalyseur. On peut citer par exemple, les méthylthiotransférases (MTTase) MiaB et RimO (Atta *et al.* 2012).

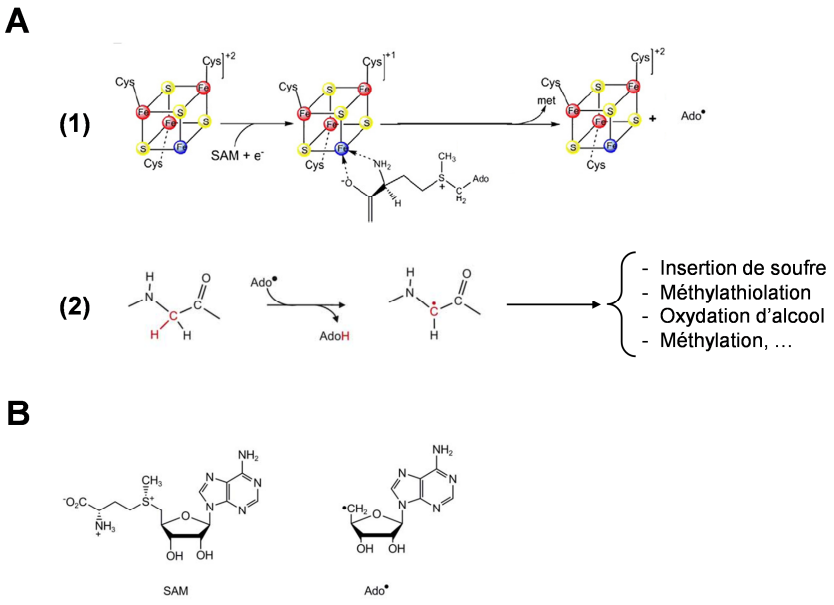


Figure I. 3. Les protéines à radical-SAM. A. Schéma des catalyses réalisées par les protéines à radical-SAM, avec **(1)** la réduction de SAM en méthionine (met) et Ado• par le centre $[4Fe\text{-}4S]^{+}$. **(2)** l'espèce Ado• permet l'activation de la liaison C-H du substrat, qui se retrouve sous forme radicalaire pour mener jusqu'au produit de la réaction. **B.** Structure de SAM et du radical Ado•. Images provenant de (Atta *et al.* 2010; Atta *et al.* 2012).

Les protéines à radical-SAM possèdent deux cofacteurs, un centre [4Fe-4S] et le SAM, essentiels pour leurs activités. Les centres [4Fe-4S] de ces enzymes sont généralement coordonnés par 3 résidus cystéines et le SAM (Berkovitch *et al.* 2004). Lorsqu'il est coordonné par le SAM, le centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ est activé sous une forme réduite, $[4Fe\text{-}4S]^{+}$. Le SAM est ensuite réduit par le centre $[4Fe\text{-}4S]^{+}$, conduisant à la formation de méthionine et d'une espèce radicalaire nommée Ado• (5'-déoxyadénosyl) (**Figure I. 3**, **A**, **(1)**). Cette espèce Ado•, formée dans la grande majorité des protéines à radical-SAM, permet généralement l'activation ciblée d'une liaison C-H du substrat à transformer (**Figure I. 3**, **A**, **(2)**). Le substrat se retrouve alors sous une forme radicalaire, pour réaliser, par exemple, l'insertion d'un atome de soufre (C-H → C-SH), une méthylthiolation (C-H → C-S-CH_3), une méthylation (C-H → C-CH_3) ou encore l'oxydation d'alcool (H_2C-OH → HC=O) (Atta *et al.* 2012; Shisler *et al.* 2012).

A . 2 . 3 . La régulation des gènes

Certaines protéines Fe/S sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Dans ce cas, les centres Fe/S sont utilisés comme « senseurs » des conditions intracellulaires (stress oxydant et nitrosant) de par leurs propriétés oxydo-réductrices vis-à-vis d'agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) ou en raison de leurs affinités pour certaines molécules comme l'oxyde nitrique. Cette régulation peut se faire au niveau traductionnel (IRP1) ou bien au niveau transcriptionnel (FNR, SoxR et IscR).

A . 2 . 3 . 1 . La protéine IRP1

IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) est une protéine, contenant un centre [4Fe-4S], que l'on retrouve uniquement chez les eucaryotes supérieurs (**Figure I. 4**).

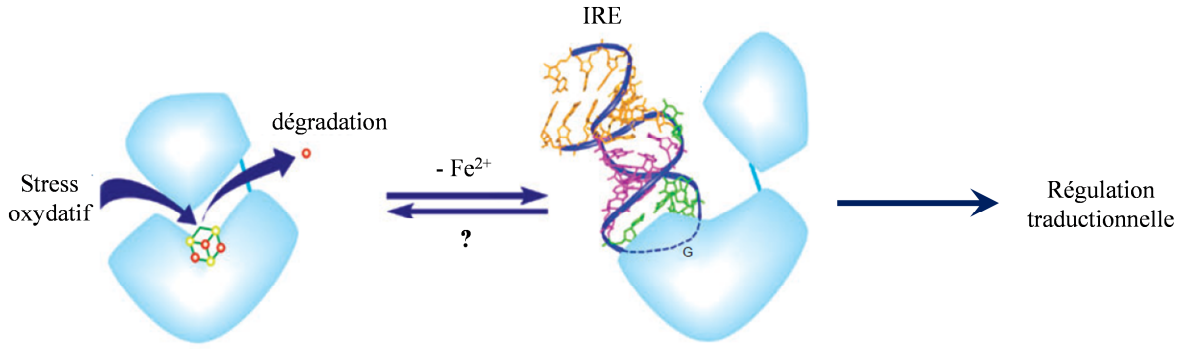


Figure I. 4. Schéma du principe de fonctionnement de la protéine IRP1. Image provenant de (Rouault 2006).

Dans sa conformation « holo-IRP1 », la protéine possède une activité aconitase, similaire à celle décrite pour l'aconitase mitochondriale (Cf. **Figure I. 2**). Lors d'un stress oxydatif ou nitrosant, le centre Fe/S va être dégradé et perdu par la protéine. La forme « apo-IRP1 » obtenue possède une conformation optimale pour se lier sur les séquences IRE (iron-responsive element) placées dans la région 5'-UTR de certains ARN messagers (Rouault 2006). Ainsi, l'apo-IRP1 active l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme du fer comme, par exemple, la ferritine.

A . 2 . 3 . 2 . Les protéines FNR, SoxR et IscR

Les protéines FNR (Fumarate and Nitrate Reduction), SoxR et IscR sont des facteurs de transcription que l'on retrouve chez les procaryotes. Ces trois protéines se présentent sous la forme d'homodimère avec un centre Fe/S par monomère.

La protéine FNR possède un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ et active ou réprime l'expression de centaine de gènes en fonction des conditions d'oxygénation de la cellule. En conditions d'hypoxie, la forme active de la protéine FNR est liée à l'ADN. Lorsque la concentration en oxygène augmente, le dioxygène réagit avec le centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ qui se convertit rapidement en un centre $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ (Kiley *et al.* 2003). Cette forme de FNR, incapable de dimériser et de se lier à l'ADN, devient inactive (Khoroshilova *et al.* 1997).

La protéine SoxR contient un centre $[2Fe\text{-}2S]^{+}$. Cette forme de la protéine, liée à l'ADN, est inactive (Kiley *et al.* 2003). En présence de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le centre Fe/S de SoxR passe d'un état réduit à un état oxydé, $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$, activant ainsi la synthèse de SoxS. SoxS est également un facteur de transcription, qui à son tour active l'expression de

gènes codant pour des protéines impliquées dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène comme, par exemple, les SOD (Superoxyde dismutase).

La protéine IscR possède un centre [2Fe-2S]. Sous cette forme, elle inhibe l'expression de l'opéron *isc*, que nous décrirons plus tard, en se fixant au niveau de son promoteur (Schwartz *et al.* 2001). En conditions de carence en centres Fe/S, IscR perd son centre Fe/S. La forme « apo-IscR », dissociée de l'ADN, permet la transcription des gènes de l'opéron *isc* dont les protéines sont impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S. « Apo-IscR » active également l'opéron *suf* codant aussi pour des protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S.

A . 2 . 4 . La réparation de l'ADN

L'ADN peut être endommagé par de nombreux facteurs endogènes ou exogènes. Lorsqu'une base de l'ADN est endommagée, une des voies de réparation passe par un mécanisme d'excision de cette base. La base endommagée est ensuite retirée et remplacée par une nouvelle base. Les BER (Base Excision Repair) glycosylases détectent et rompent la liaison N-glycosidique entre la base et l'ose. Une endonucléase reconnait ensuite le site abasique et clive le squelette « sucre-phosphate » du reste de la molécule d'ADN ; et enfin, une polymérase et une ADN ligase viennent remplacer le site vacant par une nouvelle base.

Les BER glycosylases sont des protéines nucléaires qui possèdent un centre Fe/S. Dans cette famille de protéines, on retrouve, par exemple, les protéines mutY et EndoIII qui comportent un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ (Cunningham *et al.* 1989; Lukianova *et al.* 2005). Longtemps, la présence de ce centre Fe/S a été considérée comme purement structurale, permettant la liaison de ces protéines à l'ADN, de la même manière que les structures en doigts de zinc. L'équipe de Jacqueline Barton a réalisé des expériences d'électrochimie avec des électrodes modifiées, sur lesquelles ont été fixés de manière covalente les doubles brins d'ADN. Leurs résultats indiquent que le centre [4Fe-4S] des protéines mutY et EndoIII, liées à l'ADN, acquière une activité rédox, passant d'un état réduit $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ à un état oxydé $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ grâce aux transport des électrons de l'électrode vers la protéine au travers de la molécule d'ADN (**Figure I. 5**). Ils ont également constaté que cette activité rédox du centre Fe/S des protéines est considérablement diminuée lorsque l'ADN contient une lésion, suggérant que le transfert d'électrons au travers de l'ADN est moins efficace (Boal *et al.*

2005; Genereux *et al.* 2010; Grodick *et al.* 2014). Le centre Fe/S incorporé au sein des BER glycosylases n'aurait donc pas un rôle purement structural mais serait un moyen de détecter des lésions causées sur l'ADN ainsi qu'une méthode de communication entre les protéines fixées à l'ADN. Ces hypothèses sont basées sur la théorie de transfert de charges par l'ADN, selon laquelle l'ADN est une molécule capable de réaliser des transferts d'électrons sur de longues distances (> à 40 Å) (Murphy *et al.* 1993; Sontz *et al.* 2012).

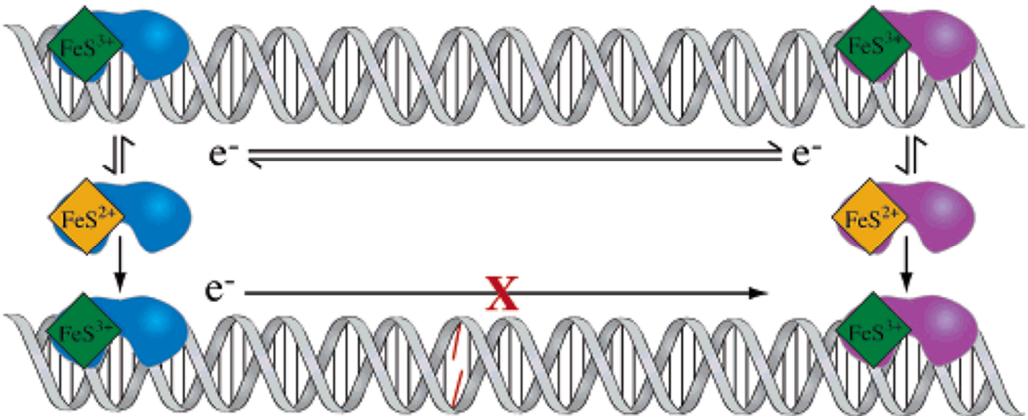


Figure I. 5. Schéma du principe de fonctionnement des BER glycosylases. Image provenant de (Boal *et al.* 2005).

En plus des BER glycosylases, un certain nombre de protéines, localisées dans le noyau, ont été identifiées comme étant des protéines Fe/S. On peut citer pour exemple les enzymes de la famille des primases, des hélicases ou encore des polymérases. Ces enzymes contiennent majoritairement des centres [4Fe-4S] coordonnés par des résidus cystéines conservés. Ce centre Fe/S semble nécessaire pour l'activité enzymatique des protéines, suggérant que le centre Fe/S joue un rôle important à la fois dans la structure et la fonction de la protéine. Enfin, il est possible d'envisager que comme les BER glycosylases, les primases, les hélicases et les polymérases utilisent l'activité rédox de leur centre Fe/S pour effectuer leurs fonctions métaboliques sur l'ADN (Wu *et al.* 2012).

B . La biogenèse des centres Fe/S

B . 1 . Historique

De nombreuses équipes sont parvenues à reconstituer, *in vitro*, un centre Fe/S au sein d'une apo-protéine avec du fer (ferreux/ferrique) et du sulfate de sodium (Na_2S). Or, *in vivo*, la probabilité que ces deux constituants se rencontrent et s'assemblent de manière coordonnée pour former des centres Fe/S est quasi nulle. De plus, ces ions en solution sont potentiellement toxiques pour les cellules, avec, par exemple, la réaction de Fenton entre un ion ferreux et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce sont probablement les raisons pour lesquelles la synthèse des centres Fe/S est réalisée par différentes machineries multi-protéiques qui permettent un assemblage contrôlé et sécurisé des différents types de centres Fe/S.

L'existence de machineries multi-protéiques de biogenèse des centres Fe/S a été initialement mise en évidence chez les procaryotes. Dans les années 90, Denis Dean a été l'un des pionniers du domaine avec la découverte de deux protéines nécessaires à l'assemblage des centres Fe/S de la nitrogénase, NifS et NifU (Jacobson *et al.* 1989; Zheng *et al.* 1993; Zheng *et al.* 1994). L'enzyme NifS est une cystéine désulfurase qui mobilise le soufre sous la forme d'un intermédiaire persulfure (NifS-SSH), par désulfurisation de la L-cystéine (**Tableau I. 2**). La protéine NifU est la protéine d'échafaudage de la biogenèse des centres Fe/S de la nitrogénase, sur laquelle les centres Fe/S sont assemblés (**Tableau I. 2**). Les gènes codant pour ces deux protéines ont été trouvés regroupés sous la forme d'un opéron, appelé *nif* (nitrogen fixation). L'association des gènes codant pour des protéines participant à un même processus sous la forme d'opéron a permis des avancées rapides dans le domaine. Sur la base d'homologies de séquence avec les gènes de l'opéron *nif*, d'autres machineries de biogenèse des centres Fe/S ont été identifiées chez les procaryotes. Le système ISC (Iron Sulfur Cluster, opéron *isc*), exprimé de manière constitutive, est la principale machinerie de biogenèse des centres Fe/S chez les procaryotes; et les systèmes SUF (SUlFur mobilization, opéron *suf*) et CSD (Cysteine Sulfinate Desulfurase, opéron *csd*), deux autres machineries spécialement adaptées pour synthétiser des centres Fe/S lorsque le métabolisme du fer ou du soufre est perturbé, ou en conditions de stress (**Tableau I. 2**) (Johnson *et al.* 2005; Xu *et al.* 2011).

Chez les eucaryotes, l'identification des machineries dédiées à l'assemblage des centres Fe/S a été rendue possible grâce au premier séquençage complet d'un organisme eucaryote : le modèle unicellulaire *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.* 1996). Par homologies de séquences et criblages génétiques, les groupes d'Elisabeth Craig et de Roland Lill ont identifié des homologues eucaryotes des protéines NifU et NifS (**Tableau I. 2**) (Kispal *et al.* 1999; Schilke *et al.* 1999). Les homologies de séquences les plus fortes ont été trouvées avec le système ISC bactérien qui semble donc avoir été particulièrement bien conservé au cours de l'évolution. Ces protéines sont localisées dans la matrice mitochondriale et constituent le système ISC (Iron-Sulfur Cluster) de biogenèse des centres Fe/S. Une seconde machinerie, nommée CIA (Cytoslic Iron-sulfur cluster Assembly), dédiée à l'assemblage des centres Fe/S pour les protéines cytosoliques et nucléaires a ensuite été découverte initialement grâce à l'identification d'un gène, nommé CFD1 (Cytosolic Fe/S cluster Deficient 1), dont la mutation entraine une perte du cluster de la protéine IRP1 (Cf. **Figure I. 4**) ainsi qu'une déficience dans l'activité d'autres protéines Fe/S cytosoliques et nucléaires (Roy *et al.* 2003). L'activité de la machinerie CIA est dépendante de la machinerie ISC, puisqu'un disfonctionnement de la machinerie ISC entraine une carence en centres Fe/S dans toute la cellule. Une troisième machinerie a ensuite été identifiée, qui est appelée EXPORT. Cette machinerie exporte depuis la mitochondrie vers le cytosol, un composé de nature inconnue, synthétisé par la machinerie ISC et permettant le fonctionnement de la machinerie CIA. En parallèle, d'autres groupes ont travaillé chez les eucaryotes supérieurs dans des lignées humaines et avec des modèles souris ou de poisson-zèbre. Un certain nombre de protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S ont été identifiées par homologies de séquence mais également en raison de leur implication dans des maladies humaines, comme par exemple, le transporteur ABCB7 de la machinerie EXPORT, responsable d'une anémie sidéroblastique liée au chromosome X avec ataxie (XLSA/A) ; ou encore, la frataxine, sujet principal de ma thèse, responsable d'une maladie neurodégénérative, l'ataxie de Friedreich (FRDA) (Beilschmidt *et al.* 2014). Cette protéine a tout d'abord été découverte dans le système eucaryote, du fait de son implication dans cette maladie. Grâce à des approches génétiques, l'homologue bactérien de la frataxine a ensuite été identifié. Etonnement cette protéine ne fait pas partie de l'opéron *isc* du système ISC bactérien.

Nom mammifères	Homologue levure	Homologue bactérien	Nom entier	Fonction biologique
Système ISC				
NFS1	Nfs1	IscS, NifS, SufS/SufE, CsdA/CsdE	Nitrogen fixation 1 homolog	Cystéine désulfurase, source de soufre
ISD11	Isd11	-	ISC biogenesis desulfurase interacting protein of 11 kDa	Augmente la stabilité de la protéine NFS1 (et stimule son activité)
ISCU	Isu1, Isu2	IscU, NifU, SufBCD, CsdB	Iron-sulfur cluster U-type protein	Protéine d'échafaudage à la biogenèse d'un centre Fe/S
FXN	Yfh1	CyaY	Frataxine	?
FDX2	Yah1	Fdx	Ferrédoxine 2	Transfert d'électron, possède un centre [2Fe-2S]
FDXR	Arh1	-	Ferrédoxine réductase	Réduit la ferrédoxine 2 lorsqu'elle est oxydée, elle-même réduite par le NADPH, H^+
HSPA9 (GRP75)	Ssq1	HscA	Heat shosck protéine 70 kDa 9	Transfert de centres Fe/S, chaperonne Hsp70
HSC20	Jac1	HscB	Chaperonne Hsp20	Transfert de centres Fe/S, chaperonne Hsp20
GRPE	Mge1	-	Glucose-regulated protein E	Echange de nucléotide, transfert de centres Fe/S
GLRX5	Grx5	-	Glutarédoxine 5	Impliquée dans le transfert de centres Fe/S, peut lier un centre [2Fe-2S] avec le glutathion
ISCA1, ISCA2	Isa1, Isa2	IscA	Iron-sulfur cluster A-type protein	Transporteur de centres [4Fe-4S] pour la maturation des protéines cibles
IBA57	Iba57			Transporteur de centres [4Fe-4S] pour la maturation des protéines cibles
NFU1	Nfu1		NifU-like protein 1	Transporteur de centres [4Fe-4S] pour la maturation des protéines cibles
NUBPL	Ind1		Nucleotide-binding protein-like	Transporteur de centres [4Fe-4S] pour la maturation des protéines cibles
BOLA	Aim1			Transporteur de centres [4Fe-4S] pour la maturation des protéines cibles
Système CIA				
ABCB7	Atm1	-	ATP binding cassette B7	Machinerie d'export du composé X
ALR	Erv1	-	Augmenter of liver regeneration	Machinerie d'export du composé X
NUBP1	Nbp35	-	Nucleotide-binding protein 1	Composant de la CIA
NUBP2	Cfd1	-	Nucleotide-binding protein 2	Composant de la CIA
Ciao1	Cia1	-		Composant de la CIA
IOP1 (NARFL)	Nar1	-	Iron-only hydrogenase-like protein 1	Composant de la CIA
	Dre2	-		Composant de la CIA

Tableau I. 2. Récapitulatif des protéines eucaryotes impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S et leurs homologues chez la levure et la bactérie.

Bien qu'un grand nombre de protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S aient été identifiées, les fonctions de ces protéines sont parfois très mal connues. Les principales étapes de biogenèse des centres Fe/S eucaryotes ont été très étudiées avec les systèmes procaryotes ISC, SUF et NIF, mais les données biochimiques pour les systèmes eucaryotes sont beaucoup plus rares et par conséquent la description du système mammifère repose largement sur le modèle procaryote. Nous allons voir plus en détails le fonctionnement de ces machineries chez les eucaryotes en nous appuyant sur les comparaisons avec les protéines procaryotes et en commençant par la machinerie ISC qui réalisent les étapes primaires de la biogenèse des centres Fe/S.

B . 2 . Le système ISC mitochondrial

La machinerie ISC est composée de quatre protéines formant un complexe, la cystéine désulfurase, NFS1, la protéine d'échafaudage, ISCU, où sont assemblés les centres Fe/S, la frataxine, FXN et la protéine ISD11. Il a également été montré que le système ISC requière une cinquième protéine, la ferrédoxine 2, FDX2, importante pour la synthèse d'un centre Fe/S (Sheftel *et al.* 2010; Shi *et al.* 2012).

B . 2 . 1 . La cystéine désulfurase, NFS1

Les enzymes ayant incorporées un cofacteur PLP (pyridoxal-5'-phosphate) réalisent un nombre très varié de réactions telles que la transamination (l'échange d'une amine primaire entre un acide aminé et un cétoacide), la décarboxylation (perte d'un acide carboxylique sous la forme de CO_2) ou encore la racémisation (changement de la conformation absolue d'un carbone asymétrique) (Eliot *et al.* 2004). Les cystéines désulfurases sont des transférases PLP-dépendantes qui réalisent la désulfurisation de la L-cystéine en L-alanine, ce qui conduit à la formation d'un persulfure, de formule générique RSSH, sur la cystéine catalytique de ces enzymes où le soufre terminal est également appelé sulfane. Les cystéines désulfurases peuvent être classées en deux groupes distincts, selon la séquence d'acides aminés où se trouve la cystéine catalytique de l'enzyme. Le groupe I possède la séquence consensus « SSGSA**C**TS » et le groupe II, la séquence « RXGHH**C**A » ; où **C** est la cystéine catalytique de l'enzyme (Xu *et al.* 2011). La protéine NFS1 fait partie du

groupe I. Il faut noter que la cystéine catalytique des cystéines désulfurases est la seule cystéine strictement conservée au cours de l'évolution (**Figure I. 6**). Les cystéines désulfurases délivrent du soufre à différentes protéines acceptrices telles qu'ISCU (biogenèse des centres Fe/S) mais aussi, ThiI qui est impliquée dans la synthèse de la thiamine, TusA qui intervient dans la thiolation des ARN de transfert et, MoaD-MoeB qui participent à la synthèse des protéines à molybdène (Shi *et al.* 2010). NFS1 est localisée dans la mitochondrie mais aussi dans le noyau (Land *et al.* 1998).

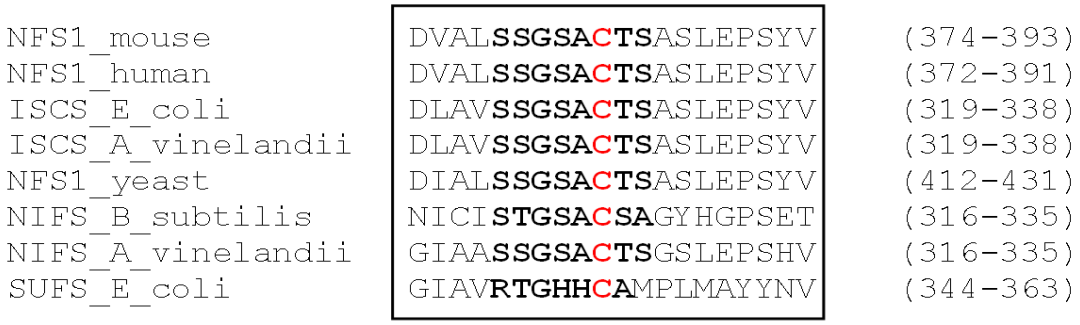


Figure I. 6. Alignement de séquences protéiques des cystéines désulfurases. L'unique cystéine conservée au cours de l'évolution est en rouge et les séquences consensus correspondant aux groupes I et II des cystéines désulfurases sont en gras.

Aujourd'hui, aucune structure de la cystéine désulfurase de mammifère NFS1 n'a été obtenue. Cependant, les structures des protéines IscS et NifS, deux homologues bactériens de NFS1, avec 60 % d'identité de séquence, ont été résolues dans les années 2000 (Fujii *et al.* 2000; Kaiser *et al.* 2000; Cupp-Vickery *et al.* 2003; Shi *et al.* 2010; Rybniker *et al.* 2014). L'ensemble de ces structures montrent une organisation en homodimère et un cofacteur PLP par monomère (**Figure I. 7**). Chaque monomère est composé de deux domaines (**Figure I. 8**, **A**) (Cupp-Vickery *et al.* 2003). Les acides aminés 1 à 15 puis 264 à 404 de la protéine IscS d'*Escherichia coli*, correspondent au petit domaine. Il renferme notamment la cystéine catalytique C328, placée au centre d'une structure flexible allant des résidus 323 à 336 (**Figure I. 8**, **B**). Cette boucle permet probablement un transfert de soufre facilité avec les différentes protéines réceptrices. Enfin, le grand domaine, correspondant aux acides aminés 16 à 263, comporte le site de fixation du PLP et du substrat ainsi que la majeure partie du domaine de dimérisation.

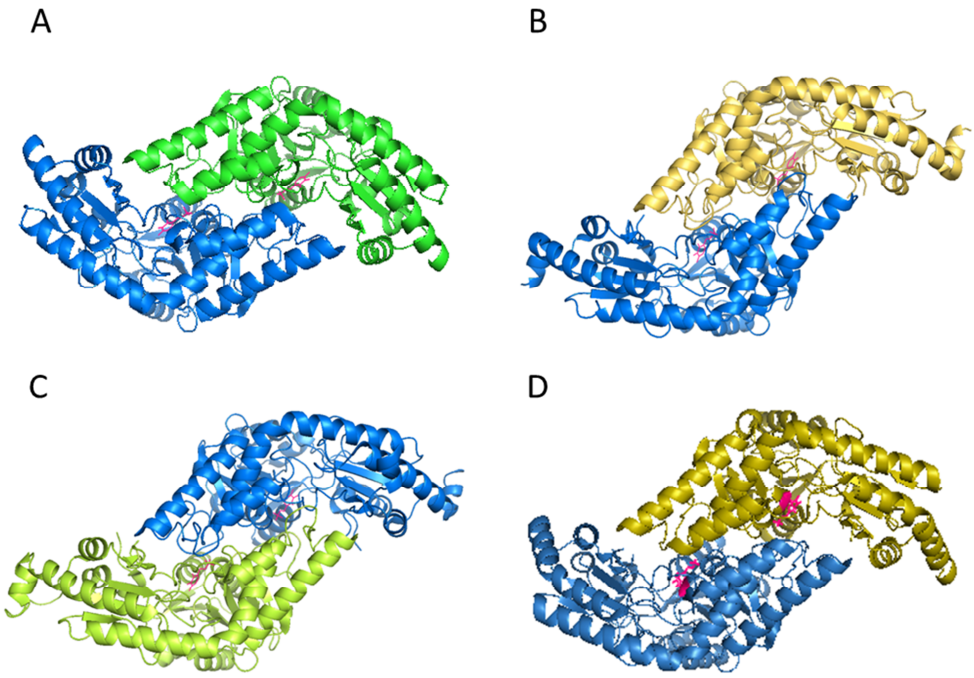


Figure I. 7. Structures cristallographiques des cystéines désulfurases NifS et IscS de différents organismes. A. Structure de NifS de *Thermatoga maritima* (PDB : 1EG5), **B.** Structure d'IscS d'*Escherichia coli* (PDB : 1P3W), **C.** Structure d'IscS d'*Escherichia coli* (PDB : 3LVM) et **D.** Structure d'IscS de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB : 4ISY). Chaque structure a été obtenue par cristallogenèse et représente un homodimère de NifS ou IscS, où chaque monomère a une couleur différente et le PLP est coloré en rose. Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB (Protein Data Bank).

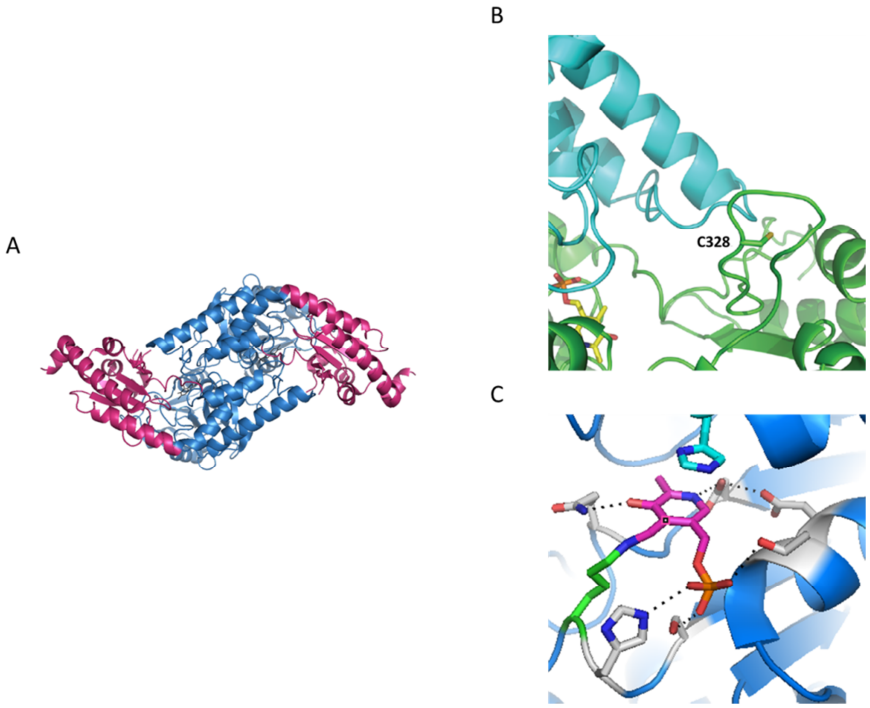


Figure I. 8. Visualisation des domaines d'IscS (Figure I. 7) et du site de fixation du PLP. A. Structure d'IscS d'*Escherichia coli* (PDB : 1P3W), le petit domaine de chaque monomère d'IscS correspond à la coloration rose alors que le grand domaine est représenté en bleu. Le PLP est en noir. **B.** Zoom sur la boucle flexible avec les acides aminés 323 à 336 contenant la cystéine catalytique C328. L'un des monomères d'IscS est en vert, l'autre en bleu et le PLP en jaune. Image de (Bridwell-Rabb *et al.* 2014) **C.** Site de fixation du PLP (en rose), rattaché à la lysine 206 (en vert) et stabilisé par des liaisons hydrogènes (pointillés noir) et une interaction « π-staking » avec l'histidine 104 (en bleu). Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Dans le site actif d'IscS d'*E. coli*, le PLP est fixé à la protéine par la lysine 206 (**Figure I. 8**, **C**) (Cupp-Vickery *et al.* 2003). Le PLP est stabilisé grâce à un réseau de liaisons hydrogènes avec la thréonine 76, l'aspartate 79 et 180, la glutamine 183, la sérine 203 et l'histidine 205 ; et également grâce à une interaction « π-stacking » avec l'histidine 104. Le site actif est essentiellement composé d'acides aminés polaires (histidines, lysines, arginines, aspartates, asparagines et tyrosines) et il est situé à la surface de la protéine, avec une solvatation importante, permettant un accès facilité pour le substrat et un échange rapide entre le substrat et le produit. L'amine primaire de la L-cystéine substrat réagit probablement avec l'imine, formé lors de la liaison entre le PLP et la lysine 206, pour former un adduit aldimine (ou base de Schiff) (**1**, **Figure I. 9**). La formation de cette aldimine diminue le pKa du proton en alpha du carbone (Cα) de la L-cystéine fixée au PLP, ce qui facilite la déprotonation par un acide aminé basique, du type aspartate ou glutamate présent à proximité, conduisant à la formation d'un quinonoïde (**2**, **Figure I. 9**). La forme quinonoïde vient ensuite déprotoner le thiol de la cystéine catalytique de NFS1 conduisant à la formation d'un adduit ketimine (**3**, **Figure I. 9**). Le thiolate obtenu sur la cystéine catalytique de NFS1 réalise ensuite une attaque nucléophile sur le soufre de la L-cystéine substrat, entrainant la formation d'un persulfure sur la cystéine catalytique de la cystéine désulfurase et d'une double liaison sur le carbone de la cystéine qui portait le soufre formant une énamine (**4**, **Figure I. 9**) (Zheng *et al.* 1994). Enfin, la tautomérisation de l'énamine en imine, suivie d'une prototropie entre les deux carbones en α de l'azote de l'imine, permet de libérer la L-alanine, sous-produit de la réaction (**5**, **Figure I. 9**). Le PLP se fixe de nouveau sur la lysine 206 et l'enzyme est prête pour un nouveau cycle catalytique.

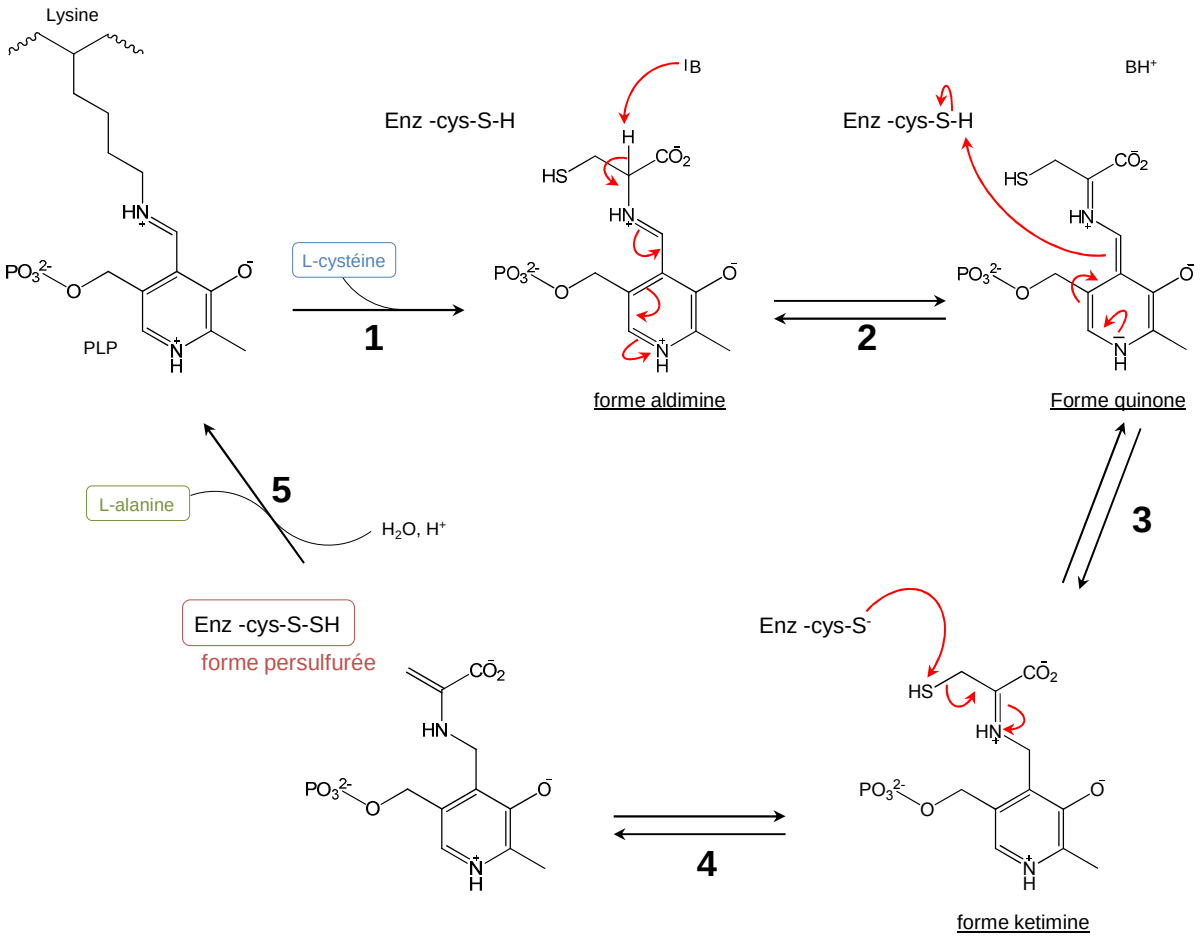


Figure I. 9. Schéma du cycle catalytique réalisé par les cystéines désulfurases. Enz-cys-S-H représente la cystéine catalytique des cystéines désulfurases et B, un acide aminé basique. Image inspirée de (Fontecave *et al.* 2008).

Pour terminer, il faut noter que la distance entre la cystéine catalytique d'IscS d'*E. coli*, placée dans une boucle flexible, et le PLP est de 17 Å, suggérant un changement de conformation important afin de réaliser la persulfuration de la cystéine catalytique. De plus, étant donné la distance qui sépare les deux PLP, qui est d'environ 30 Å, il a été proposé que les deux sous-unités du dimère d'IscS fonctionnent de manière indépendante et non pas d'une façon coopérative (Cupp-Vickery *et al.* 2003; Amela *et al.* 2013).

B . 2 . 2 . La protéine ISD11

La protéine ISD11 fait partie de la famille des protéines « LYR » à laquelle appartient aussi les sous-unités B22 et B14 du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale et qui sont caractérisées par un motif de trois acides aminés L, Y et R (parfois K) conservés. C'est une protéine conservée chez tous les eucaryotes mais aucune protéine homologue n'a été

découverte chez les procaryotes. Tout comme NFS1, ISD11 est une protéine localisée dans la matrice mitochondriale mais aussi dans le noyau (Shi *et al.* 2009). La protéine ISD11 interagit avec NFS1 mais son rôle est encore mal connu et controversé. Si la communauté scientifique s'accorde à dire qu'ISD11 augmente la stabilité de la protéine NFS1, certains démontrent qu'avec ou sans ISD11, l'activité cystéine désulfurase de NFS1 n'est pas modifiée (Adam *et al.* 2006; Wiedemann *et al.* 2006) ; alors que d'autres observent une stimulation de l'activité cystéine désulfurase de la protéine NFS1 en présence d'ISD11 (Pandey *et al.* 2012; Pandey *et al.* 2013). Enfin, le complexe NFS1-ISD11 semble se présenter dans une stœchiométrie 1:2 (NFS1:ISD11) (Colin *et al.* 2013).

De nombreuses études, décrites ci-dessous, ont permis d'identifier une interaction entre les protéines NFS1 et ISCU, la protéine d'échafaudage de la biogenèse des centres Fe/S, formant un complexe hétérodimérqiue ($\alpha_2\beta_2$).

B . 2 . 3 . La protéine d'échafaudage, ISCU

B . 2 . 3 . 1 . Structure de la protéine ISCU

La protéine ISCU est la protéine d'échafaudage des centres Fe/S, c'est-à-dire, la protéine sur laquelle se construisent les centres Fe/S. Elle fait partie des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution (Zheng *et al.* 1998). Cependant, aucune structure d'ISCU eucaryote n'a été résolue, bien qu'une structure de la protéine ISCU de souris soit référencée dans la PDB sans que les données n'aient encore été publiées. Les structures de la forme apo-IscU d'*E. coli* et de *Haemophilus influenza* ont été résolues par RMN (Ramelot *et al.* 2004; Kim *et al.* 2009). Ces structures montrent une organisation « β_3-α_4», avec une configuration particulière, où l'un des côtés de la protéine est uniquement composé d'hélices α, alors que l'autre face ne contient que des feuillets β anti-parallèles (**Figure I. 10**). On remarque aussi que l'extrémité N-terminale de la protéine est déstructurée.

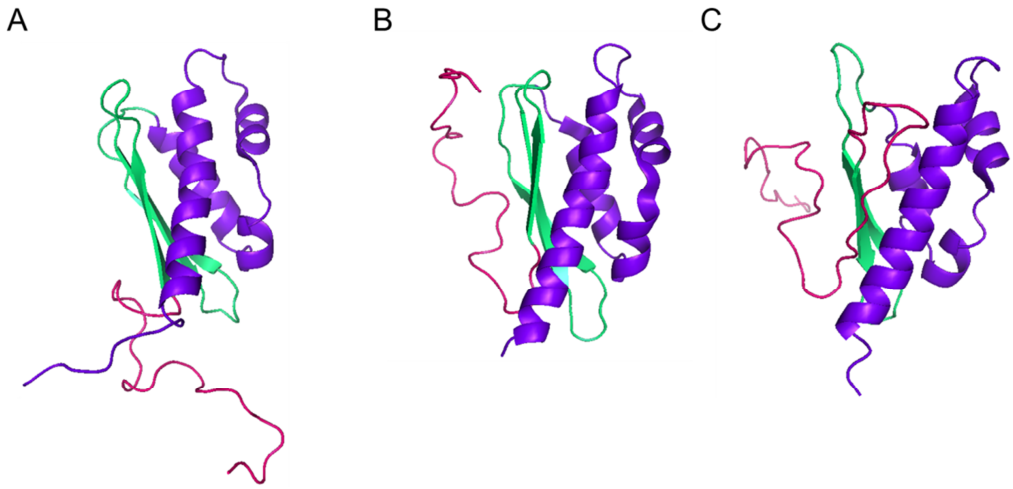


Figure I. 10. Structures d'IscU de chez *Haemophilus influenza* et *Escherichia coli* obtenues par RMN. A. Structure d'IscU *Haemophilus influenzal* (PDB : 1Q48). **B.** Structure d'IscU D39A d'*Escherichia coli*, qui représente la forme structurée (S) d'IscU (**B**) ou partiellement déstructurée (D) d'IscU (**C**) (PDB : 2KQK et 2L4X). Chaque structure comporte une extrémité N-terminale déstructurée (en rose), un côté composé de feuillets β (en vert) et un autre côté composé d'hélices α (en violet). Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

L'équipe de John Markley, de l'université du Wisconsin-Madison, a étudié la structure de la protéine IscU d'*E. coli* par différentes techniques de RMN. D'après des expériences EXSY (EXchange SpectroscopY, RMN 2D), qui permettent de mettre en évidence et de quantifier des échanges chimiques, ils ont démontré que la protéine IscU est en équilibre entre deux conformations (Kim *et al.* 2009; Kim *et al.* 2012; Markley *et al.* 2013) ; une hypothèse émise dix en plus tôt par l'équipe de James Cowan (Mansy *et al.* 2002; Mansy *et al.* 2004). Ainsi, en solution, la protéine IscU d'*E. coli* est présente à 70 % - 80 % sous une forme structurée (notée (S), **Figure I. 10**, **B**) et à 30 % - 20 % sous une forme partiellement déstructurée (notée (D), **Figure I. 10**, **C**), où le feuillet β_1 est déstructuré par rapport à la forme (S) d'IscU. L'existence de ces deux espèces est corrélée à un changement de conformation de quatre prolines, P14, P35, P100 et P101; dont les prolines P14 et P101 sont strictement conservées (Dai *et al.* 2012). Les quatre prolines de la forme (D) d'IscU, sont en conformation *cis* alors que dans la forme (S), les prolines P14 et P101 sont en conformation *trans*. Une étude similaire, menée avec la protéine ISCU humaine, montre qu'en solution la protéine ISCU existe également sous ces deux conformations (S) et (D). Mais dans ce cas, la forme majoritaire d'ISCU serait la forme partiellement déstructurée (D), avec près de 72 %, alors que la forme structurée (S) est présente à 28 %.

B . 2 . 3 . 2 . Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$

Deux structures de complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ ont été résolues en 2010 et 2012. Dans ces structures, l'interaction entre les protéines IscS et IscU se fait principalement entre la partie C-terminale d'IscS et les tyrosines 3 et 11 (N-terminale), la glycine 38, la valine 40, la lysine 42 (feuillet β_2), la lysine 59, la glycine 64 (feuillet β_3) et la lysine 103 d'IscU (hélice α_5) (Shi *et al.* 2010) (**Figure I. 11**). Il a été montré que les deux tyrosines d'IscU en position 3 et 11 sont indispensables à l'interaction entre les deux protéines (Shi *et al.* 2010) ; et que la délétion des 29 derniers acides aminés de la séquence d'IscS (376 à 404), entraine une inhibition de la formation du complexe entre IscS et IscU, sans altérer l'activité cystéine désulfurase de la protéine (Urbina *et al.* 2001). Il a également été montré que la forme $IscS\text{-}\Delta_{376\text{-}404}$ diminue la vitesse de formation du centre Fe/S, ce qui suggère que la formation d'un complexe entre IscS et IscU est indispensable à la synthèse d'un centre Fe/S sur IscU. Enfin, la constante de dissociation du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ a été calculée et déterminée à 2 µM ; une valeur bien inférieure à la concentration cellulaire des protéines IscS et IscU estimée par Urbina *et al.*, (10µM), ce qui suggère que l'interaction est physiologiquement pertinente (Urbina *et al.* 2001).

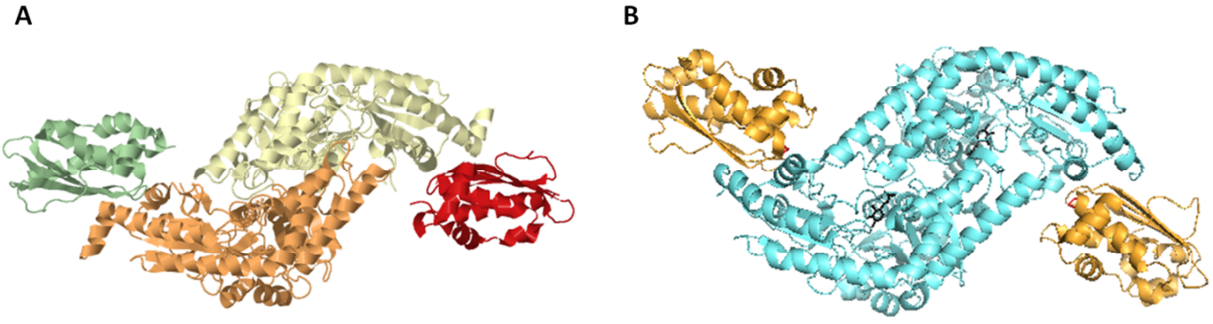


Figure I. 11. Structures des complexes $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*Echérichia coli* et *Archaeoglobus fulgidus*, obtenues par cristallogenèse. A. Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*Escherichia coli*. Chaque monomère d'IscS (en orange et en jaune) interagit avec une protéine IscU (en vert et en rouge) (PDB : 3LVL). **B.** Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*Archaeoglobus fulgidus*, avec les protéines « IscS-like » (en bleu) et IscU D35A (en orange) (PDB : 4EB5). Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Il a été montré par RMN que la formation du complexe entre IscS et IscU dépend de la conformation de la protéine IscU (Kim *et al.* 2011; Kim *et al.* 2012; Markley *et al.* 2013). L'affinité de la forme partiellement déstructurée d'IscU (D) (**Figure I. 10**, **C**) est plus grande pour IscS que la forme structurée (S) (**Figure I. 10**, **B**). Ces résultats ont permis de proposer une séquence d'évènements, dans laquelle, la forme (D) serait compétente pour l'assemblage d'un centre Fe/S, en raison de sa plus grande flexibilité qui faciliterait les changements de

conformation successifs pour constituer alternativement ou de manière séquentielle des centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. La formation des centres Fe/S stabiliserait la forme (S) d'IscU, conduisant à la dissociation du complexe IscS-IscU. Cette dynamique d'association et de dissociation des protéines IscS et IscU a également été proposée lors d'une étude *in vivo* chez *A. vinelandii* sur les protéines IscS et IscU, non-surexprimées dans les bactéries (Raulfs *et al.* 2008). Ces auteurs sont parvenus à purifier quatre espèces différentes : apo-IscU, holo-IscU, IscS-apo-IscU et IscS-holo-IscU ; et leur interprétation est que la présence de ces quatre formes différentes indique que la formation d'un centre Fe/S *in vivo* est un procédé dynamique impliquant une interaction réversible entre les protéines IscS et IscU.

Cependant les données publiées par le groupe de John Markley sont aujourd'hui controversées par la publication récente des travaux de l'équipe d'A. Pastore, qui démontre que c'est au contraire la forme structurée (S) d'IscU qui se lie préférentiellement à IscS (Yan *et al.* 2014). Des résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire vont également dans ce sens.

B . 2 . 3 . 3 . Structure du centre Fe/S d'ISCU

Le zinc a été utilisé afin de mimer un centre Fe/S dans la protéine IscU bactérienne. Deux structures d'IscU, résolues par RMN et par cristallogenèse, ont été obtenues avec un atome de zinc incorporé dans leurs structures (Ramelot *et al.* 2004; Liu *et al.* 2005) **(Figure I. 12)**.

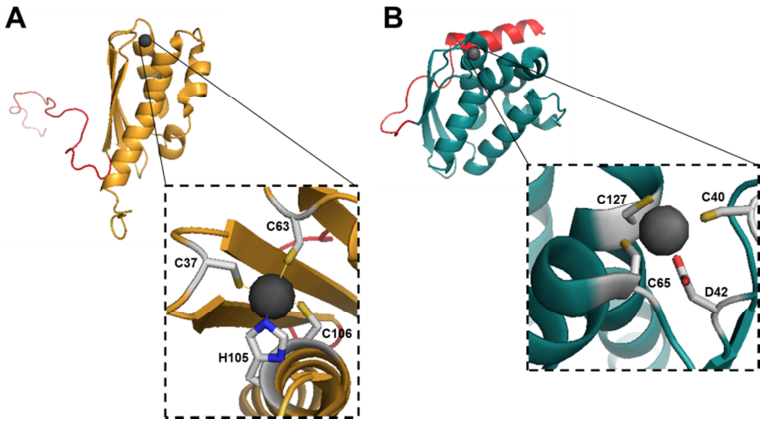


Figure I. 12. Structures des protéines IscU *Haemophilus influenza* et *Streptococcus pyogenes* ayant incorporé un atome de zinc. A. Structure d'IscU *Haemophilus influenza* (PDB : 1R9P) obtenue par RMN, avec un zoom sur l'atome de zinc et ses ligands, à comparer avec la forme apo-IscU dans la **Figure I. 10**, **A**. **B.** Structure d'IscU *Streptococcus pyogenes* (PDB : 1SU0) obtenue par cristallogenèse, avec un zoom sur l'atome de zinc et ses ligands. L'atome de zinc est représenté par une sphère grise et l'extrémité N-terminale des protéines IscU sont en rouge. Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Dans cette structure, le zinc est coordonné par les 3 cystéines conservées d'IscU et soit par une histidine (H105, IscU *H. influenza*, **Figure I. 12**, **A**), soit par un aspartate (D42, IscU *Streptococcus pyogene*, **Figure I. 12**, **B**). Ces deux acides aminés d'IscU sont strictement conservés chez les procaryotes et chez les eucaryotes (**Figure I. 13**). Il a été récemment démontré *in vitro* que l'atome de zinc incorporé dans la structure d'IscU permet de stabilisé le repliement de la protéine (Iannuzzi *et al.* 2014). Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que le site d'assemblage du centre Fe/S d'ISCU est composé de ces trois cystéines et d'un ligand non cystéinylé. Cependant, le débat persiste sur la nature du quatrième ligand d'IscU coordinant le centre Fe/S ; car des analyses spectroscopiques par Mössbauer et Raman indiquent que le quatrième ligand est probablement un oxygène provenant, par exemple, d'un aspartate (Agar *et al.* 2000) ; d'autres avancent que la substitution de l'aspartate par une alanine, permettant d'obtenir une forme (S) d'IscU plus stable, ne semble pas altérer la fixation du centre Fe/S sur IscU (Kim *et al.* 2011) et enfin, de récents travaux de l'équipe d'Annalisa Pastore démontrent que l'histidine H105 et l'aspartate D39 d'IscU d'*E. coli* peuvent chacun être ligand de l'atome de zinc (Iannuzzi *et al.* 2014).



Figure I. 13. Alignement des séquences protéiques correspondant aux protéines NifU, IscU et ISCU. Les acides aminés conservés sont représentés en couleur : le rouge pour les trois cystéines, ligands du centre Fe/S, l'aspartate (en bleu) et l'histidine (en orange) comme les quatrièmes ligands possible du centre Fe/S ; enfin, en vert, la séquence LPPVK de reconnaissance de la protéine chaperonne HscA.

Enfin, on constate que le domaine N-terminal de la protéine IscU de *S. pyogènes* (**Figure I. 12**, **B**) est replié sous la forme d'une hélice α et que l'extrémité N-terminale d'IscU

de *H. influenza* (**Figure I. 12**, **A**) montre une structure naissante d'hélice α, ce qui suggère que cette extrémité N-terminale est capable de se structurer et pourrait donc jouer un rôle dans le fonctionnement de la protéine. Cette conformation très structurée d'IscU est également observée dans les structures cristallographiques des complexes $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*E. coli* et d'*Archaeoglobus fulgidus* (Shi *et al.* 2010; Marinoni *et al.* 2012) (**Figure I. 11**).

Une structure cristallographique du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$, avec le mutant D35A d'IscU d'*Archaeoglobus fulgidus* a été récemment résolue, par le groupe de Juan Fontecilla-Camps, avec un centre Fe/S incorporé au sein du complexe (**Figure I. 14**) (Marinoni *et al.* 2012).

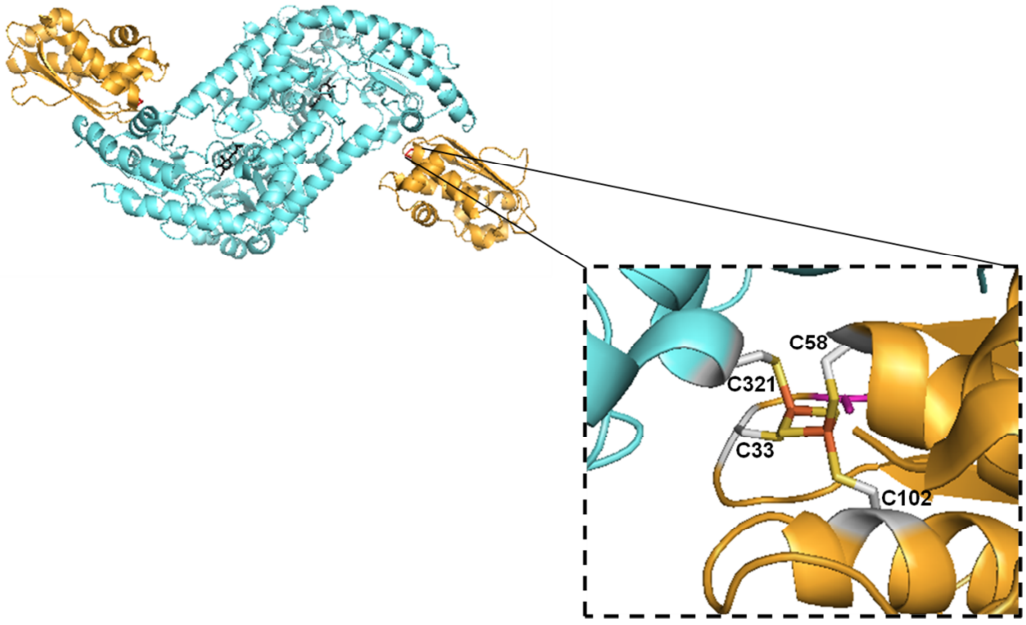


Figure I. 14. Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ d *Archaeoglobus fulgidus* obtenue par cristallogenèse. B. Structure du complexe $(IscS\text{-}IscU)_2$ d'*Archaeoglobus fulgidus* où les protéines « IscS-like » (en bleu) et IscU D35A (en orange) lient un centre [2Fe-2S] (PDB : 4EB5). Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Dans cette structure, le centre Fe/S est lié par les 3 cystéines conservées d'IscU (C33, C58 et C102) et de manière surprenante, le quatrième ligand est la cystéine catalytique (C321) d'IscS. À partir de la structure cristallographique présentée dans la **Figure I. 14** et grâce à des calculs de mécanique quantique et moléculaire (QM/MM), une modélisation de la protéine IscU a été obtenue dans laquelle, la cystéine catalytique d'IscS est remplacée par l'aspartate D35 (correspondant à l'aspartate D42 d'IscU d'*H. influenza*), comme quatrième ligand du centre Fe/S. Le modèle proposé par les auteurs de ces travaux, est que la coordination du

centre Fe/S par la cystéine catalytique d'IscS serait un état intermédiaire de la biogenèse des centres Fe/S.

B . 2 . 3 . 4 . Mobilisation du soufre : Transfert de soufre de NFS1 vers ISCU

Au début des années 2000, l'équipe de Michael Johnson a mis en évidence un transfert de soufre entre les protéines IscS et IscU d'*Azotobacter vinelandii* (Smith *et al.* 2001). Johnson et ses collaborateurs ont démontré par spectrométrie de masse en protéine entière, que la protéine IscU est poly-persulfurée (S-$(S)_n$-H) sur toutes ses cystéines en présence d'IscS et de L-cystéine (Smith *et al.* 2001; Smith *et al.* 2005). Un transfert de soufre a également été observé entre les protéines IscS et IscU d'*E. coli* par l'équipe de Larry Vickery, qui a montré que ce transfert cible des résidus cystéines d'IscU (Urbina *et al.* 2001). Le transfert de soufre, ou transpersulfuration, est l'attaque nucléophile d'une des cystéines d'IscU sur le soufre terminal du persulfure d'IscS, conduisant à la formation d'un persulfure sur IscU. Au moment de la rédaction de ce manuscrit un transfert de soufre entre les protéines mammifères NFS1 et ISCU a été mis en évidence (Bridwell-Rabb *et al.* 2014). L'étude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU va constituer l'un de mes projets de recherche.

L'étude du transfert de soufre entre IscS et IscU d'*A. vinelandii* par l'équipe de M. Johnson, a montré que la forme sauvage d'IscU avait de 1 à 6 soufres supplémentaires (Smith *et al.* 2001). Les trois cystéines d'IscU ont été substituées par des résidus alanines ; et chacun des mutants C37A, C63A et C106A d'IscU est capable d'incorporer du soufre sous forme de persulfure et de polysulfure (Smith *et al.* 2005). Ces résultats suggèrent que le transfert de soufre ne cible pas spécifiquement une des cystéines d'IscU. Sur la base de ces observations, il a été proposé que le transfert de soufre entre la cystéine désulfurase et la protéine d'échafaudage soit une étape clé, nécessaire à la biogenèse des centres Fe/S. Cependant, le rôle du persulfure sur IscU est controversé ; car l'équipe de J. Cowan a démontré que la forme persulfurée d'IscU (*Thermatoga maritima*) n'est pas capable d'assembler un centre Fe/S sur la protéine en présence de fer et de DTT, ce qui suggère que la forme persulfurée d'IscU est une forme « sans issue » dispensable à la biogenèse des centres Fe/S.Enfin, la structure du complexe IscS-IscU contenant un centre Fe/S (**Figure I. 14**) suggère qu'en plus du soufre transféré à IscU, le second soufre, nécessaire à la formation d'un centre [2Fe-2S], pourrait être

directement incorporé au centre Fe/S sans l'intermédiaire du transfert à ISCU par réduction du persulfure de NFS1.

B . 2 . 4 . La ferrédoxine mitochondriale : FDX2

Chez les procaryotes, l'opéron *isc* contient également le gène *fdx* codant pour une ferrédoxine (Fdx). De plus, il a été montré par deux équipes différentes qu'IscS et holo-Fdx d'*E. coli* forment un complexe (Kim *et al.* 2013; Yan *et al.* 2013). L'homologue humain de cette ferrédoxine, FDX2, est essentiel pour la biogenèse des centres Fe/S (Sheftel *et al.* 2010; Shi *et al.* 2012). Les travaux de Kim *et al.* montrent qu'en présence IscS et de L-cystéine, indépendamment de la protéine IscU, le centre Fe/S de Fdx passe d'un spectre UV-visible caractéristique d'un état réduit à un état oxydé, suggérant que les électrons provenant de la forme réduite du centre Fe/S de Fdx ont été transférés aux protéines de la machinerie de biogenèse des centres Fe/S ; et il a été proposé notamment que la ferrédoxine réduise le persulfure d'IscS en sulfure (Kim *et al.* 2013). Cependant, il est étonnant qu'une enzyme réalisant une chimie à un électron soit capable de catalyser une réduction de persulfure qui devrait nécessiter deux électrons simultanément. Une réduction à un électron conduirait à la formation d'un radical per-thyl qui est un intermédiaire très réactif. Dans une autre étude *in vitro*, avec les protéines bactériennes, il a été montré que Fdx est capable de fournir des électrons au centre [2Fe-2S] d'IscU et que cela stimule le couplage de deux centres [2Fe-2S] en un seul centre [4Fe-4S] (Chandramouli *et al.* 2007). Nous avons également étudié l'effet de FDX2 sur la réduction des persulfures.

B . 2 . 5 . Modèle biogenèse des centres Fe/S

De nombreuses études de reconstitution de centre Fe/S ont été réalisées *in vitro*. L'une d'entre elles montre que la formation des centres Fe/S sur un dimère d'IscU (*A. vinelandii*) est séquentielle (Agar *et al.* 2000), avec un premier centre $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$, puis un second synthétisés au sein du dimère d'IscU. Ces deux centres $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ semblent pouvoir se combiner pour former un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$. Il faut préciser que ces résultats ont été obtenus avec une protéine IscU purifiée sous la forme d'un dimère, où les deux centres [2Fe-2S] sont proches et peuvent se réarranger pour former un centre [4Fe-4S]. Cependant, ces résultats sont

difficiles à interpréter lorsque l'on regarde les structures cristallographiques des complexes $(IscS\text{-}IscU)_2$ (**Figure I. 11**) ; où les deux protéines d'IscU, sous la forme monomère, sont très éloignées l'une de l'autre, ce qui suggère que la formation d'un centre [4Fe-4S] requière la dimérisation de deux protéines IscU portant chacune un centre [2Fe-2S]. Il a été montré que le réarrangement de deux centres $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ à un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ nécessite l'apport de deux électrons qui peuvent être fourni par la ferrédoxine (Chandramouli *et al.* 2007).

En plus du soufre, la constitution d'un centre Fe/S requière un apport de fer. La source de fer nécessaire lors de la biogenèse des centres Fe/S est encore mal définie ; soit une métallo-chaperonne apporte le fer, soit le fer est libre. L'équipe de Cowan a démontré par des expériences d'ITC (Isothermal Calorimetry Titration) que la protéine IscU est capable de lier deux atomes de fer avec des constantes de dissociation de l'ordre de 2 à 3 µM (Nuth *et al.* 2002). Cependant, d'autres études affirment que la protéine IscU ne lie pas de fer (Smith *et al.* 2001; Urbina *et al.* 2001; Adinolfi *et al.* 2004). À l'heure actuelle, l'origine du fer, nécessaire à la biogenèse des centres Fe/S est toujours sujet à controverse ; et notamment, il a été proposé que la protéine frataxine soit une métallo-chaperonne apportant le fer à la machinerie de biogenèse des centres Fe/S. Cette fonction de la protéine sera plus amplement discutée dans la partie suivante de ce chapitre. Enfin, il existe également un débat sur la chronologie des évènements, pour savoir qui du fer ou du soufre arrive en premier lors de la synthèse d'un centre Fe/S. Ou encore, pour savoir si leur arrivée est simultanée. Certains pensent que le soufre arrive en premier car le transfert de soufre ne nécessite pas de fer (Smith *et al.* 2001; Urbina *et al.* 2001); alors que d'autres pensent que le fer est présent avant le soufre, car la forme persulfurée d'IscU ne lie pas le fer (Nuth *et al.* 2002).

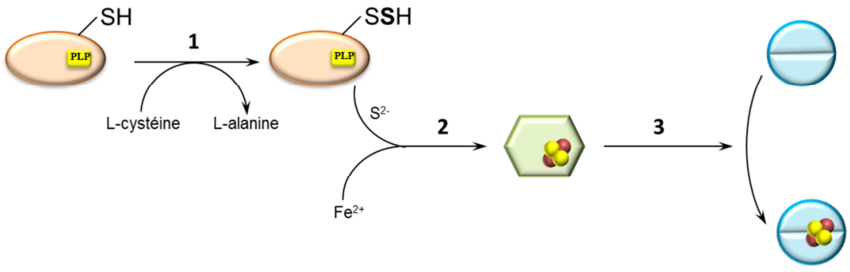


Figure I. 15. Schéma d'organisation de la biogenèse des centres Fe/S. La cystéine désulfurase est représentée en orange avec son cofacteur PLP, la protéine d'échafaudage est en vert et enfin la protéine réceptrice est en bleu.

Bien qu'il soit difficile aujourd'hui de proposer un mécanisme clair pour l'assemblage des centres Fe/S, les données actuelles permettent de proposer une séquence en trois étapes

principales pour la biogenèse des centres Fe/S et la maturation des protéines Fe/S (**Figure I. 15**):

1) La mobilisation du soufre par les cystéines désulfurases PLP-dépendantes

2) L'assemblage du centre Fe/S sur la protéine d'échafaudage, à partir du fer et du soufre mobilisés.

3) Le transfert du centre Fe/S néosynthétisé vers l'apo-protéine cible.

B . 2 . 6 . Transfert du centre Fe/S d'ISCU vers les apo-protéines cibles

Chez la plupart des procaryotes, l'opéron *isc* contient les gènes *hscA* et *hscB,* qui codent respectivement pour une Hsp70 (Heat shock protein 70 kDa) et une Hsp20 (Heat shock protein 20 kDa), indiquant qu'un système de chaperonnes intervient dans la biogenèse des centres Fe/S. L'étape de transfert du centre Fe/S néosynthétisé sur la protéine ISCU vers une apo-protéine cible est une étape importante de la biogenèse des centres Fe/S, qui nécessite l'intervention de protéines chaperonnes (**Figure I. 15**, **3**) (Muhlenhoff *et al.* 2003). Les systèmes chaperonne/co-chaperonne tels que le tandem DnaK/DnaJ rencontré chez les procaryotes ou le système Ssc1/Mdj1 trouvé chez *S. cerevisiae* aident au repliement des protéines et préviennent l'agrégation des protéines dénaturées, mais sont inefficaces dans des expériences de biogenèse des centres Fe/S (Wu *et al.* 2005) ; probablement en raison de la faible spécificité de reconnaissance « enzyme-substrat » qui permet à ces systèmes d'interagir avec un grand nombre de protéines substrats. Il semble donc qu'un système de chaperonne/co-chaperonne soit spécialement dédié à la machinerie de biogenèse des centres Fe/S. Chez la levure, on retrouve le système Ssq1/Jac1 ; et le tandem HSPA9/HSC20, chez les mammifères. Les systèmes HscA/HscB bactériens et Ssq1/Jac1 de levure ont été très étudiés et un certain nombre de similitudes ont été observées entre les deux organismes. Les données biochimiques étant beaucoup plus rares pour le système mammifère, sa description repose largement sur les modèles procaryotes et de levure.

B . 2 . 6 . 1 . Le système de chaperonne/co-chaperonne

Le mécanisme de transfert du centre Fe/S fait intervenir un complexe ternaire entre IscU, HscA et HscB, dans lequel l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP est utilisé pour réaliser le transfert de centre Fe/S vers les protéines acceptrices (Bonomi *et al.* 2008).

La protéine chaperonne HscA est composée de deux domaines ; un domaine de liaison à l'ATP dans sa partie N-terminale, qui possède une activité ATPase, et un domaine SBD (Substrat Binding Domain) en C-terminal, pour l'interaction avec la protéine IscU par un motif conservé « LPPVK » d'IscU (Silberg *et al.* 2001; Hoff *et al.* 2002; Hoff *et al.* 2003) (**Figure I. 13**). La co-chaperonne HscB contient également deux domaines ; un domaine « J », placé en N-terminal, dont trois acides aminés conservés constituent le motif « HPD », nécessaire à la stimulation de l'activité ATPase d'HscA ; et un domaine « C », en C-terminal, qui interagit avec les leucines L92 et L96 et la phénylalanine F153 de la protéine IscU (Hoff *et al.* 2000; Fuzery *et al.* 2008; Fuzery *et al.* 2011). Il a été montré que HscB interagit préférentiellement avec la protéine HscA-(ATP) alors que la protéine IscU possède une meilleure affinité pour HscA-(ADP).

L'ensemble des études réalisées sur le système HscA/HscB suggère un mécanisme de transfert de centres Fe/S séquentiel, où la protéine holo-IscU est tout d'abord recrutée par la co-chaperonne HscB (**(1)**, **Figure I. 16**) (Kim *et al.* 2009), permettant une interaction de meilleure affinité entre holo-IscU et HscA-(ATP) (**(2)**, **Figure I. 16**) (Kim *et al.* 2013). L'activité ATPase de HscA est stimulée d'un facteur 5 en présence de la co-chaperonne HscB ou de la protéine substrat IscU et d'un facteur supérieur à 100 en présence des deux protéines (Hoff *et al.* 2000) ; et il a été démontré que cette stimulation de l'activité ATPase est corrélée avec une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP en ADP et non pas une augmentation de la vitesse d'échange entre l'ADP et l'ATP (Silberg *et al.* 2004). L'hydrolyse de l'ATP en ADP entraine de manière concomitante le transfert du centre Fe/S vers la protéine cible, un changement de conformation du domaine SBD, passant d'une forme ouverte à une forme fermée et le relargage de la protéine HscB (**(3)**, **Figure I. 16**). Pour finir, l'échange de nucléotides entraine la dissociation du complexe HscA-IscU (**(4)** et **(5)**, **Figure I. 16**).

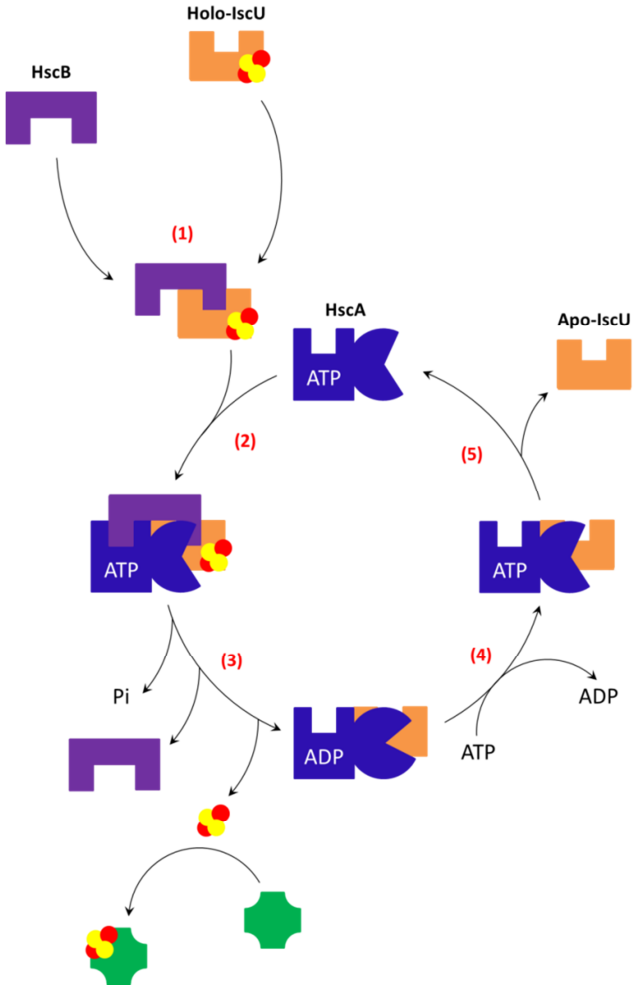


Figure I. 16. Schéma du mécanisme séquentiel de transfert du centre Fe/S avec le système HscA/HscB. (1) HscB recrute holo-IscU. **(2)** Le complexe HscB-holo-IscU lie HscA-(ATP). **(3)** L'hydrolyse de l'ATP entraine la dissociation de HscB, et le transfert du centre Fe/S vers une apo-protéine. **(4)** L'échange de nucléotide permet la **(5)** dissociation de la protéine apo-IscU. Image inspirée de (Lill *et al.* 2012).

Chez les eucaryotes, la protéine Mge1 est nécessaire pour l'échange ADP/ATP sur Ssq1 (Lutz *et al.* 2001; Dutkiewicz *et al.* 2003; Dutkiewicz *et al.* 2004; Andrew *et al.* 2006; Ciesielski *et al.* 2012; Uhrigshardt *et al.* 2013). Aucun homologue de Mge1 n'a été identifié chez les procaryotes, probablement car l'efficacité intrinsèque d'échange de nucléotide de HscA est plus élevée que celle de ses homologues eucaryotes (Ssq1 et HSPA9).

Chez les mammifères, la co-chaperonne HSC20 a été caractérisée. Sa structure est très proche de son homologue bactérien HscB (Uhrigshardt *et al.* 2013) ; cependant, l'extrémité N-terminale des deux protéines est très différente, avec deux motifs « CXXC » sur HSC20, suggérant la fixation d'un atome de zinc. Il a été démontré que la protéine HSC20 est l'homologue fonctionnel de la protéine Jac1 ; car l'expression de la protéine HSC20 permet de restaurer un phénotype sauvage de croissance cellulaire dans une souche de levure *Δjac1*. Cependant, la protéine HSC20 est non-fonctionnelle si les quatre cystéines placées en N-

terminale sont mutées en sérine (Uhrigshardt *et al.* 2010). Ces motifs « CXXC » sont donc indispensables à la fonction de la protéine, mais le rôle de ce domaine n'a pas encore été déterminé.

Enfin, une étude récente chez *S. cerevisiae* montre que le domaine d'interaction d'Isu1 (L63, V72 et F94), impliqué dans l'interaction avec Jac1, est également engagé dans l'interaction avec Nfs1 (Majewska *et al.* 2013). L'affinité des deux protéines, Nfs1 et Jac1, pour Isu1 est équivalente, suggérant un mécanisme d'association/dissociation ordonné d'Isu1 entre les deux protéines au cours de la biogenèse des centres Fe/S.

B . 2 . 6 . 2 . Les transporteurs intermédiaires

Comment la protéine ISCU est-elle capable de distribuer des centres Fe/S à des protéines mitochondriales très différentes les unes des autres ? Il semble que la distribution des centres Fe/S passe par un réseau de transporteurs intermédiaires, capables de délivrer ces centres Fe/S spécifiquement à certaines protéines cibles. L'utilisation de ces transporteurs permet probablement de restreindre le nombre de protéines qui interagissent avec la protéine d'échafaudage ISCU et de toucher un plus grand nombre de protéines cibles (**Figure I. 17**).

Différents transporteurs intermédiaires ont été identifiés. Il a été montré dans différents organismes eucaryotes que la glutarédoxine 5 (GLRX5) et ses homologues participent à la biogenèse des centres Fe/S mitochondriaux et cytosoliques (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002; Wingert *et al.* 2005). Chez *S. cerevisiae*, la délétion du gène *grx5* codant pour la protéine Grx5 entraîne une accumulation de fer dans la mitochondrie et sur la protéine Isu1 (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002; Muhlenhoff *et al.* 2003; Ye *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent que la protéine Grx5 mitochondriale est impliquée dans le transport de centres Fe/S. Les glutarédoxines font partie de la superfamille des thiorédoxines, qui comprend notamment deux sous-familles, les glutarédoxines dithiols et monothiols. Les glutarédoxines dithiols, dont la glutarédoxine 1 cytosolique et la glutarédoxine 2 mitochondriale, sont des oxydoréductases capables de réduire les protéines glutathionylées grâce à deux résidus cystéines conservés dans un motif « CP(Y/F)C ». Les glutarédoxines monothiols, comprenant la glutarédoxine 5 mitochondriale, GLRX5, et la glutarédoxine 3, GLRX3 ou PICOT, n'ont qu'un seul résidu cystéine conservé dans un motif « CGFS » et ne possèdent pas d'activité oxydoréductase. Ces glutarédoxines sont capables de lier un centre

[2Fe-2S] à l'interface de deux sous-unités (Picciocchi *et al.* 2007; Johansson *et al.* 2011). Ce centre Fe/S est coordonné par la cystéine conservée de ces enzymes et par le groupement thiol d'une molécule de glutathion (GSH). De récentes études chez *A. vinelandii* et *S. cerevisiae* ont montré que la protéine Grx5 étaient capables de recevoir un centre Fe/S transféré depuis la protéine d'échafaudage Isu1 (Shakamuri *et al.* 2012; Uzarska *et al.* 2013).

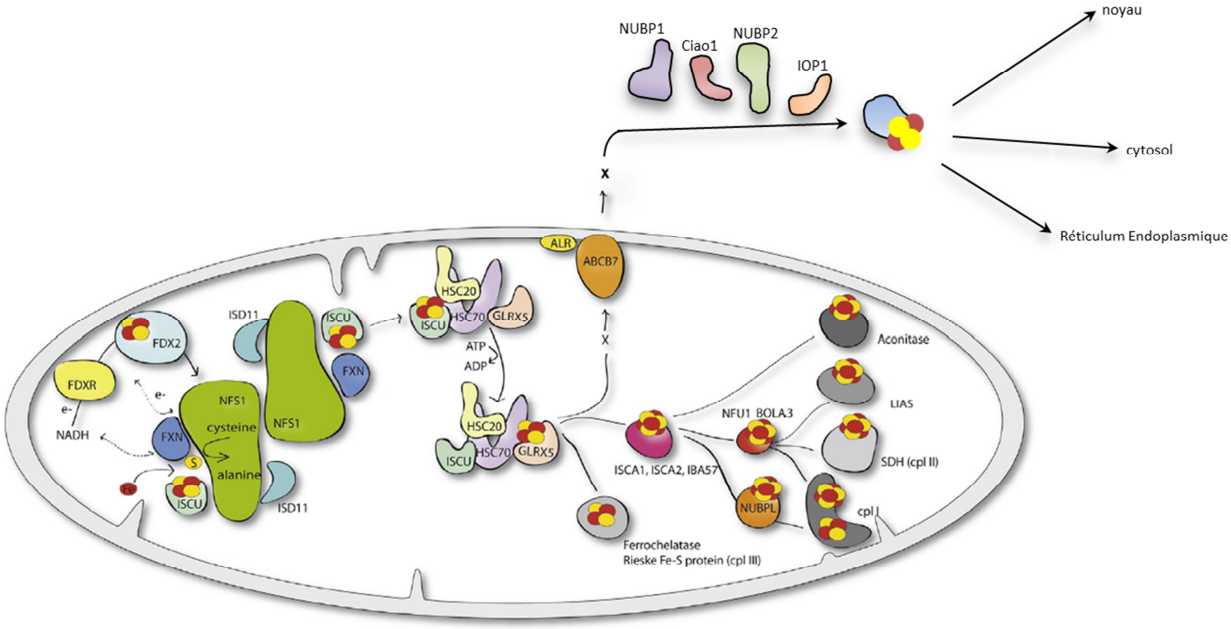


Figure I. 17. Schéma représentatif de la biogenèse des centres Fe/S chez les mammifères. Image provenant de (Beilschmidt *et al.* 2014).

Les protéines ISCA1 et ISCA2 font partie de la famille des protéines d'échafaudage de type A. Ces protéines possèdent trois cystéines conservées, permettant la liaison d'un centre Fe/S (Jensen *et al.* 2000; Kaut *et al.* 2000). Le rôle de cette famille de protéines est encore sujet à controverse. Tout d'abord présentées comme des protéines d'échafaudage, au même titre qu'ISCU (Krebs *et al.* 2001), des études ont montré que ISCA1 et IscA, son homologue bactérien, étaient capables de lier un atome de fer par dimère de protéine (Ding *et al.* 2007; Lu *et al.* 2010), suggérant que la forme « holo-ISCA1 » est une source de fer pour la biogenèse des centres Fe/S. Une étude plus récente indique que les protéines d'échafaudage de type A seraient d'avantage impliquées dans le transport des centres Fe/S (Ollagnier-de-Choudens *et al.* 2001; Vinella *et al.* 2009). Avec l'aide de la protéine IBA57, les protéines ISCA1 et ISCA2, peuvent transporter des centres [4Fe-4S] jusqu'aux apo-protéines cibles comme l'aconitase mitochondriale ou les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Sheftel *et al.* 2012; Beilschmidt *et al.* 2014).

La protéine IND1 est capable de lier un centre Fe/S et semble indispensable à la maturation du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale (Bych *et al.* 2008; Sheftel *et al.* 2009). Il pourrait s'agir d'un transporteur dédié au complexe I.

Enfin, La protéine NFU1 est probablement impliquée dans la maturation des complexes I, II et III de la chaine respiratoire mitochondriale ainsi que dans la maturation de la protéine LIAS (lipoic acid synthase) (Cameron *et al.* 2011; Navarro-Sastre *et al.* 2011).

B . 2 . 7 . Le cas particulier du système SUF

Chez les procaryotes, le système ISC est la principale machinerie de biogenèse des centres Fe/S. Lors d'un stress cellulaire (stress oxydant ou carence en fer), l'expression des protéines qui composent la machinerie SUF est activée. Il a été montré récemment que le système SufS-SufE est plus résistant au stress oxydant que le système IscS-IscU, ce qui pourrait expliquer son rôle essentiel en conditions de stress (Dai *et al.* 2012). Le système SUF est principalement composé d'une cystéine désulfurase, SufS et d'une protéine d'échafaudage sous la forme d'un complexe, SufBCD. Contrairement au système ISC, le système SUF possède une petite protéine supplémentaire, appelée SufE, qui interagit avec SufS et SufBCD (Loiseau *et al.* 2003; Layer *et al.* 2007). La protéine SufE se retrouve persulfurée sur son unique cystéine C51 après un transfert de soufre provenant de SufS. D'après la structure de SufE d'*E. coli*, la cystéine C51 est positionnée dans une cavité hydrophobe et n'est pas exposée au solvant, ce qui suggère que la forme persulfurée de la cystéine C51 de SufE est protégé du solvant, et donc d'oxydations ou de réductions non désirées (Goldsmith-Fischman *et al.* 2004). La stratégie de la démultiplication des intermédiaires persulfurés pourrait donc jouer un rôle essentiel pour permettre une biogenèse des centres Fe/S efficace en conditions de stress, potentiellement en protégeant les intermédiaires persulfures.

B . 3 . Biogenèse des centres Fe/S cytosoliques

B . 3 . 1 . La machinerie EXPORT, le composé X et CIA

Le système CIA (Cytosolic iron-sulfur cluster assembly) est la machinerie cytosolique de biogenèse des centres Fe/S. Cependant cette machinerie ne fonctionne pas de manière autonome car elle est dépendante de la machinerie ISC. Dans le système levure, un transporteur ATP-dépendant, nommé Atm1, localisé dans la membrane interne de la mitochondrie et essentiel à la synthèse des centres Fe/S cytosoliques a été identifié. Il a été proposé que ce transporteur exporte un composé de nature inconnue, appelé composé X, requis par la machinerie CIA pour l'assemblage des centres Fe/S cytosoliques (**Figure I. 17**). Chez les eucaryotes supérieurs, l'homologue d'Atm1 est appelé ABCB7 (ATP binding cassette B7) (Ye *et al.* 2010). De même que pour Atm1, la déplétion du transporteur ABCB7 diminue l'activité des protéines Fe/S cytosoliques et nucléaires alors que les protéines Fe/S mitochondriales ne sont pas affectées (Kispal *et al.* 1999; Cavadini *et al.* 2007). La protéine NFS1 étant mitochondriale et aucune autre cystéine désulfurase n'ayant été identifiée dans le cytosol, il est fort probable que le composé X contienne du soufre sous une forme utilisable par la machinerie CIA, comme un dérivé de persulfure (Lill *et al.* 2012; Beilschmidt *et al.* 2014). En ce sens, des données récentes suggèrent qu'Atm3, un homologue d'Atm1 chez les plantes, est capable de transporter du glutathion oxydé (GSSG) et du glutathion trisulfure (GS-S-SG) (Schaedler *et al.* 2014). La structure cristallographique d'Atm1 a également révélé que ce transporteur est capable de fixer du GSH (Srinivasan *et al.* 2014). Enfin, la déplétion du GSH chez *S. cerevisiae* conduit à un déficit de centres Fe/S cytosoliques (Sipos *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2011). Il est donc possible qu'Atm1 transporte un dérivé de glutathion persulfuré. La sulfhydryl oxydase nommée ALR (augmenter of liver regeneration), qui catalyse la formation de ponts disulfure dans l'espace inter-membranaire, semble également être critique pour l'export de ce composé X mais son rôle exacte reste à définir (**Figure I. 17**) (Lange *et al.* 2001; Sipos *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2011).

Le composé X exporté est ensuite pris en charge par la machinerie d'assemblage CIA. Les protéines NUBP1, NUBP2, Ciao1 et IOP1 (Balk *et al.* 2004; Balk *et al.* 2005; Netz *et al.* 2007; Srinivasan *et al.* 2007; Song *et al.* 2008; Stehling *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008) ont été identifiées comme appartenant au système CIA de biogenèse des centres Fe/S (**Figure I. 17**).

Leurs fonctions exactes ne sont pas encore clairement déterminées et un grand nombre de protéines intervenant dans cette machinerie CIA sont probablement encore à découvrir (Zhang *et al.* 2008).

B . 3 . 2 . Un domaine de controverse

Les protéines NFS1, ISD11, ISCU et NFU1 semblent également être exprimées en très faible quantités dans le cytosol (Land *et al.* 1998; Tong *et al.* 2003; Tong *et al.* 2006; Shi *et al.* 2009). La présence de ces acteurs du système ISC mitochondrial de la biogenèse des centres Fe/S dans d'autres compartiments permet d'envisager d'autres fonctions pour ces protéines. Par exemple, il a été montré que la forme cytosolique de NFS1 n'est probablement pas impliquée dans la biogenèse des centres Fe/S (Biederbick *et al.* 2006) et que la protéine ISCU cystosolique est probablement impliquée dans la réparation et/ou la régénération des centres Fe/S après un stress oxydatif ou une période de carence en fer (Tong *et al.* 2006). Enfin, de récentes études proposent que la protéine NFS1 cytosolique soit impliquée dans la synthèse du cofacteur Moco (Molubdenum cofactor) ou encore que sa forme nucléaire soit impliquée dans la thiolation des ARN de transfert (Marelja *et al.* 2013; Shigi 2014).

C . La frataxine : de l'ataxie de Friedreich à la biogenèse des centres Fe/S

La frataxine (FXN) est une petite protéine mitochondriale impliquée dans la biogenèse des centres Fe/S. Une déficience en frataxine conduit à une pathologie nommée l'ataxie de Friedreich (Campuzano *et al.* 1997).

C . 1 . Les origines génétiques de l'ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich (FRDA) est une maladie génétique récessive autosomale (non portée par le chromosome sexuel X). C'est l'ataxie héréditaire la plus fréquente chez les Caucasiens avec 1 individu sur 50 000 atteint de la maladie (Puccio *et al.* 2000). Elle est

caractérisée par une neurodégénérescence progressive associée à des lésions du cervelet et de la voie spino-cérébelleuse, couplées le plus souvent à une hypertrophie cardiaque. Dans des cas plus rares, les patients FRDA développent un diabète et des anomalies osseuses.

L'ataxie de Friedreich est causée par une expression insuffisante de la frataxine (Campuzano *et al.* 1996). Le défaut de synthèse de la frataxine est la conséquence d'une expansion anormale d'un triplet de nucléotide « GAA » dans le premier intron du gène FRDA codant pour la frataxine. Ce gène est localisé sur le chromosome 9 chez l'Homme (Chamberlain *et al.* 1988). Chez un sujet sain, le nombre de répétition du trinucléotide « GAA » n'excède pas 40 ; alors que chez les patients FRDA, 60 à près de 2000 répétitions « GAA » peuvent être observées (Puccio *et al.* 2000). La grande majorité (96 %) des patients FRDA sont « homozygotes », c'est-à-dire qu'ils possèdent cette anomalie génétique sur chacun des deux allèles du gène FRDA. Cette répétition « GAA » entraine une inhibition de la transcription du gène FRDA. Dans certains cas (4% des patients FRDA), la maladie est dite « hétérozygote », chez ces patients, un seul des deux allèles présente la répétition anormale de « GAA » tandis que le second possède des mutations ponctuelles ou des délétions. Ces mutations entrainent l'inhibition de la traduction de la frataxine ou altèrent sa fonction. Quinze mutations ponctuelles ont été recensées. Elles touchent principalement des résidus conservés tels que l'aspartate 122 (D122Y), la glycine 130 (G130V), l'asparagine 146 (N146K), la glutamine 148 (Q148R), l'isoleucine 154 (I154F), le tryptophane 155 (W155R) ou encore l'arginine 165 (R165C) (Tsai *et al.* 2011; Pastore *et al.* 2013).

A l'échelle de la cellule, l'ataxie de Friedreich se traduit par une déficience de l'activité des protéines Fe/S, suivi d'une accumulation de fer dans la mitochondrie, d'une diminution de la production d'ATP et d'une sensibilité au stress oxydant plus élevée (Puccio *et al.* 2000; Puccio *et al.* 2001).

C . 2 . La frataxine

C . 2 . 1 . Localisation et maturation

Chez les eucaryotes, la frataxine est localisée dans la matrice mitochondriale (Koutnikova *et al.* 1997), et dans le cytosol pour les procaryotes. Chez les mammifères, la

protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 210 acides aminés (23 kDa) (174 acides aminés pour la levure *S. cerevisiae*), contenant une séquence d'adressage à la mitochondrie en position N-terminale (Koutnikova *et al.* 1998). La maturation de la frataxine passe par un processus en deux étapes. Dans la matrice mitochondriale, le précurseur de la frataxine interagit tout d'abord avec la sous-unité β de la protéine MPP (mitochondrial processing peptidase). Chez les mammifères, la liaison peptidique entre la glycine G41 et la leucine L42 du précurseur de la frataxine est ensuite rompue pour obtenir une forme intermédiaire de 19 kDa (acides aminés 42 à 210 et 22 à 174 pour *S. cerevisiae* (Branda *et al.* 1999)). Enfin, cette forme intermédiaire est clivée entre la lysine K80 et la sérine S81 pour obtenir la forme mature de la frataxine (acides aminés 81à 210, 14 kDa et 52 à 174 pour *S. cerevisiae*) (Condo *et al.* 2006; Schmucker *et al.* 2008). Il a été proposé que ce processus en deux étapes, réalisé par la MPP, permette de réguler la fonction de la frataxine (Branda *et al.* 1999).

C . 2 . 2 . Structure tridimensionnelle

La frataxine est une protéine très conservée, présente dans la plupart des organismes de la bactérie jusqu'aux mammifères (Gibson *et al.* 1996; Adinolfi *et al.* 2002). Seule la partie N-terminale, correspondant à la séquence d'adressage à la mitochondrie, n'est présente que chez les eucaryotes. Plusieurs structures de frataxine ont été résolues par RMN et cristallogenèse, notamment des frataxines de mammifères (FXN, *Homo Sapiens*) (Dhe-Paganon *et al.* 2000; Musco *et al.* 2000), de levures (Yfh1, *S. cerevisiae*) (He *et al.* 2004) et de la bactérie (CyaY, *E. coli*) (Cho *et al.* 2000; Nair *et al.* 2004) (**Figure I. 18**).

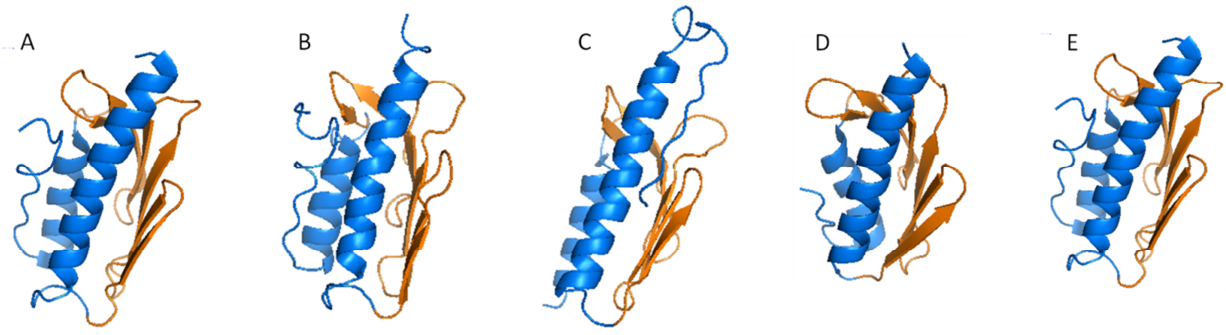


Figure I. 18. Structures des protéines frataxines eucaryotes et procaryotes. A. Structures de la protéine FXN (*Homo sapiens*) obtenue par cristallogenèse (**A**) et par RMN en solution (**B**) (PDB : 1EKG et 1LY7, respectivement). **C.** Structure en solution de Yfh1 (*S. cerevisiae*) (PDB : 1XAQ). **D.** Structures de CyaY d'*E. coli* obtenue par RMN (**D**) et par cristallogenèse (E) (PDB : 1SOY et 1EW4, respectivement). Les deux hélices α sont colorées en bleu et les feuillets β sont en orange. Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Les structures de ces frataxines provenant de différents types d'organismes sont très similaires, ce qui indique un niveau de conservation important au cours de l'évolution. Toutes ces structures montrent que la frataxine est un monomère dans lequel les extrémités N-terminale et C-terminale sont repliées sous formes d'hélices α qui encadrent un assemblage continu de feuillets β anti-parallèles dans un motif en « sandwich α-β » (α-β_{5-7}-α) (Dhe-Paganon *et al.* 2000). On retrouve l'une des deux faces de la protéine composée uniquement de feuillet β placés dans un même plan ; et l'autre face exclusivement constituée d'hélice α, parallèles entre elles et au plan des feuillets β. La structure tertiaire de la frataxine est unique et ne concorde avec aucunes autres structures de protéine. Cependant, le motif en sandwich α-β est une structure secondaire que l'on retrouve dans un certain nombre de protéines, comme par exemple, les protéines HAH1 (*Homo sapiens*, PDB : 1TL5), ATX1 (levure, PDB : 1FES) et CopZ (*Bacillus subtilis*, PDB : 1P8G) (Bencze *et al.* 2006) ; ce motif est également retrouvé dans le domaine SUD-C (SARS-unique domain-C-terminal) de la protéine NSP3 du coronavirus SARS (Severe acute respiratory syndrome) (Johnson *et al.* 2010). Seule la protéine Nqo15, une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, possède une structure tertiaire proche de la frataxine, mais n'a aucune identité de séquence avec celle-ci (Pohl *et al.* 2007), et aucunes informations sur la fonction de la frataxine n'ont pu être obtenues par homologie de séquence. De manière remarquable, la répartition entre les feuillets β et les hélices α, placés de part et d'autre de la protéine, est similaire à celle observée dans les structures des protéines IscU.

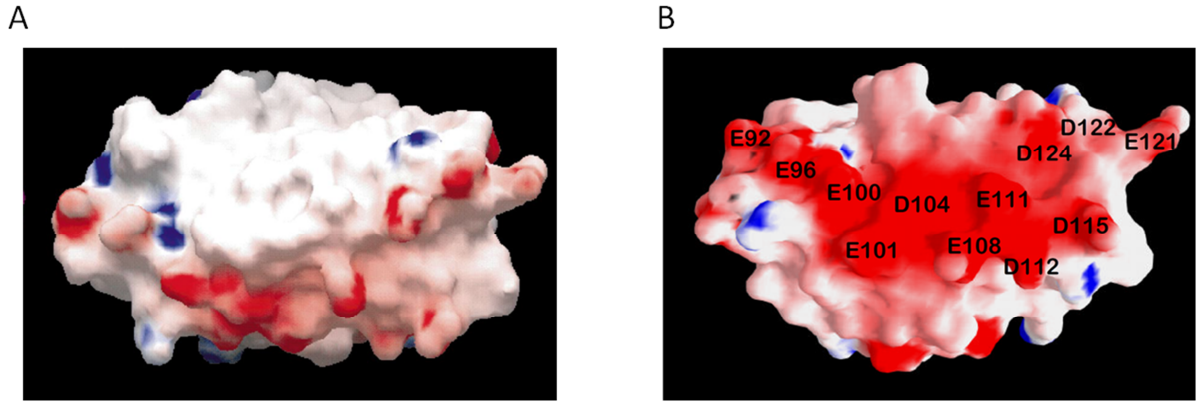


Figure I. 19. Distribution des charges sur la surface de la protéine FXN (*Homo sapiens*). Les acides aminés chargés négativement sont colorés en rouge et ceux chargés positivement, en bleu. **A.** Visualisation des feuillets β (vers le haut), composés d'acides aminés neutres (blanc) et l'hélice α_1 (vers le bas), composée essentiellement d'acides aminés chargés négativement. **B.** Visualisation du domaine acide correspondant à l'hélice α_1 et une partie du feuillet β_1. Images de (Dhe-Paganon *et al.* 2000; Musco *et al.* 2000).

L'étude de la répartition des charges à la surface de la frataxine montre un arrangement asymétrique, avec une première face de la protéine contenant principalement des

acides aminés chargés (**Figure I. 19**, **A**). Cette partie de la protéine possède un domaine acide, correspondant à l'hélice α_1 et à une partie du feuillet β_1, composé d'acides aminés acides (aspartate et glutamate) chargés négativement à un pH physiologique (Cho *et al.* 2000; Lee *et al.* 2000) (**Figure I. 19**, **B**). La seconde face de la protéine, correspondant aux autres feuillets β, est principalement composée d'acides aminés neutres. Cette répartition inégale des charges sur la protéine suggère la présence de sites d'interaction protéine-protéine. Enfin, la structure de la protéine FXN ne présente aucune cavité et aucun site de fixation pour un métal n'est prédictible.

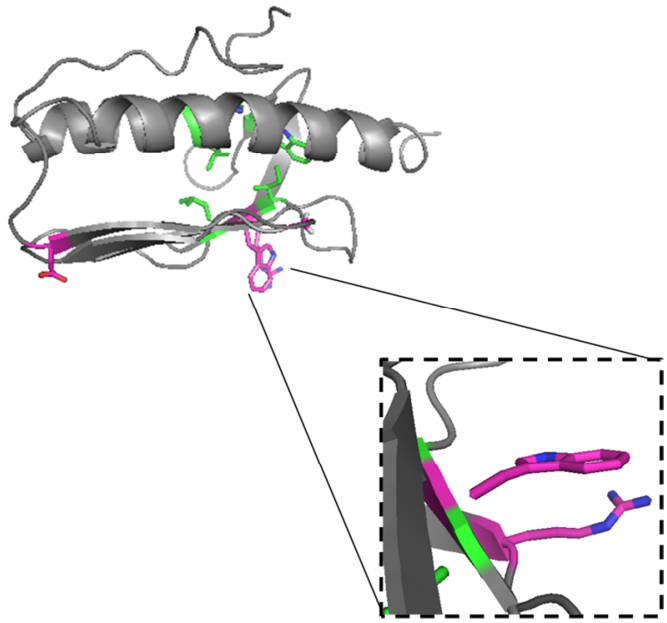


Figure I. 20. Localisation des mutants FRDA de la FXN. La structure de la frataxine humaine est représentée en gris et les acides aminés correspondant aux mutants I154F, L156P, W173G, L182H et H183R sont en vert et ceux correspondant aux mutants D122Y, G130V, R165P et W155F sont en rose. L'encadrement permet un zoom sur l'interaction « π-cation » entre le tryptophane W155 et l'arginine R165. Ces structures ont été obtenues grâce au logiciel PyMOL, de traitement des données récupérées sur le site PDB.

Les structures de la protéine FXN permettent de formuler différentes hypothèses sur le disfonctionnement de certains mutants FRDA. Les mutants I154F, L156P, W173G, L182H et H183R, dont les acides aminés sont positionnés au cœur de la protéine, entrainent probablement une déstructuration de la protéine ; alors que pour les mutants D122Y, G130V, R165P et W155F c'est probablement la fonction de la protéine qui est altérée (**Figure I. 20**). Le mutant W155F est un cas particulier, qui correspond à une forme sévère de la maladie. Le tryptophane W155 est impliqué dans une interaction « π-cation » avec l'arginine R165 qui pointe vers l'extérieur de la protéine et qui pourrait constituer un motif important pour l'activité de la protéine (**Figure I. 20**). Il faut noter cependant que le mutant R165P entraine une forme moins sévère de la maladie que le mutant W155F.

C . 3 . Frataxine et métabolisme du fer : Quelle fonction ?

Depuis sa découverte en 1996, la frataxine est une protéine qui suscite un très grand intérêt, principalement en raison de son implication dans l'ataxie de Friedreich. Un très grand nombre d'études ont été entreprises pour comprendre la fonction de cette protéine, ce qui a donné lieu à un certain nombre de controverses en raison de résultats contradictoires ou non reproductibles ; notamment en ce qui concerne le rôle de la frataxine comme protéine de stockage du fer et comme chaperonne du fer.

C . 3 . 1 . La frataxine comme protéine de stockage du fer ?

Chez les patients FRDA, le défaut d'expression de la protéine FXN entraine une accumulation de fer dans la mitochondrie. Ces observations suggèrent que FXN intervient directement ou indirectement dans l'homéostasie du fer.

L'équipe de Grazia Isaya (Clinique Mayo, Rochester, USA) a été la première à réaliser des expériences *in vitro* sur la protéine recombinante de levure, Yfh1. G. Isaya et ses collaborateurs ont montré que la protéine purifiée se présente sous la forme d'un monomère soluble qui s'oligomérise en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}, 20 à 50 équivalents de fer) pour former différents types d'édifices de stœchiométrie variable (Adamec *et al.* 2000). Ces oligomères sont composés de trimères de frataxine organisés en 6-, 12-, 24- et 48-mères. Le fer semble jouer un rôle spécifique dans ce processus puisqu'aucun assemblage de la protéine n'a été observé avec d'autres ions divalents tels que Ca^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+} ou Mn^{2+}. De plus, il a été montré qu'Yfh1 possède une activité ferroxydase (catalyse de l'oxydation des ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} par le dioxygène), similaire à celle décrite pour la ferritine (Lawson *et al.* 1989). Cette activité semble nécessaire au mécanisme d'assemblage de la frataxine (Park *et al.* 2003), *via* la formation d'oxyde de fer qui induirait l'oligomérisation de la protéine. Au final, la forme oligomérisée de la frataxine est une sphère d'une taille d'environ 1 MDa, contenant près de 3 000 atomes de fer sous la forme de ferrihydrite, un biominéral composé d'oxyde ou d'hydroxyde de fer ferrique **(Figure I. 21)** (Adamec *et al.* 2000; Karlberg *et al.* 2006). Ce type de structure rappelle celle décrite pour la ferritine qui est organisée en oligomère de 24 sous-unités, capable de fixer plus de 4 500 atomes de fer, également sous la forme de ferrihydrite (Nichol *et al.* 2003). Par ailleurs, l'expression de la ferritine mitochondriale dans des cellules

Hela ou de levure, déficientes en frataxine, est capable de restaurer un phénotype sauvage, ce qui est en accord avec le rôle de la frataxine comme protéine de stockage du fer (Campanella *et al.* 2004; Zanella *et al.* 2008).

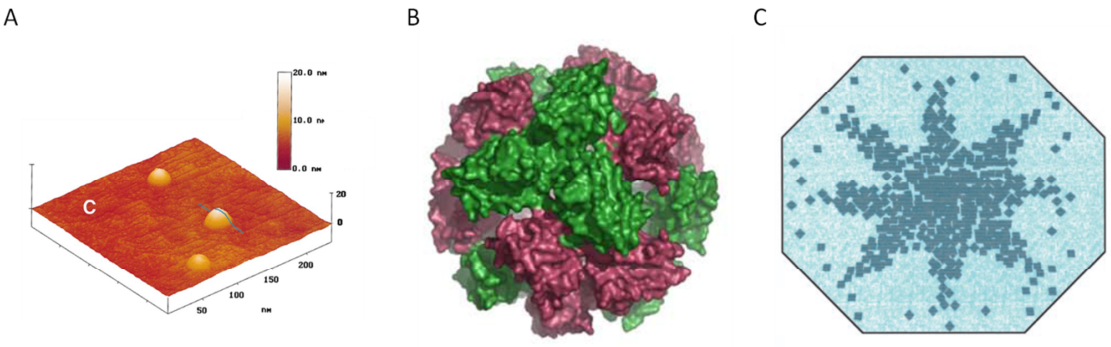


Figure I. 21. Les oligomères d'Yfh1 (*S. cerevisiae*). A. Image AFM (Atomic Force Microscopy) des oligomères de 1 MDa de Yfh1 obtenus avec 40 équivalents de Fe^{2+} (image de (Adamec *et al.* 2000)). **B.** Structure supposée de l'assemblage des trimères de Yfh1 (vert et rose) sous la forme de 24-mères (image de (Karlberg *et al.* 2006)). **C.** Assemblage supposé du fer (losanges noires) au sein de la structure oligomérique d'Yfh1 (bleu). D'après l'équipe d'Isaya, le fer ferrique est conservé au cœur de la structure, alors que le fer ferreux est fixé à la surface de la structure (image de (Park *et al.* 2003)).

Cependant, à la différence de la frataxine, l'oligomérisation de la ferritine ne nécessite pas de fer (Agar *et al.* 2000). L'équipe de G. Isaya a ensuite démontré que la forme holo-oligomérisée de Yfh1 (Yfh1-Fe) est capable de transférer du fer ferreux (Fe^{2+}) à une apo-protéine comme la ferrochélatase qui est la protéine chaperonne permettant l'insertion du fer dans la protoporphyrine IX (Park *et al.* 2003). Ainsi, ces résultats suggèrent que la forme Yfh1-Fe est capable d'incorporer à la fois des ions ferriques (Fe^{3+}), au sein de la structure oligomérique, et des ions ferreux (Fe2+), à proximité de la surface de la protéine (Park *et al.* 2003). Enfin, cette équipe a observé un processus réversible d'assemblage/désassemblage des structures oligomériques de la protéine Yfh1. Ils ont proposé que ce processus d'oligomérisation traduise un rôle de détoxification du fer *in vivo*, en plus de son rôle de protéine de stockage du fer (Gakh *et al.* 2006).

L'équipe de Grazia Isaya a également montré qu'une forme intermédiaire immature de la frataxine humaine (FXN_{56-210}) présente les mêmes caractéristiques que son homologue, Yfh1 (Cavadini, 2002). Cependant, l'équipe d'A. Pastore a montré que la forme mature de FXN (FXN_{81-210}) est incapable de s'auto-assembler en présence de fer (Adinolfi *et al.* 2002). Chez les mammifères, le phénomène d'oligomérisation fer-dépendante serait donc potentiellement spécifique de la forme immature de la protéine. Parallèlement ils ont montré que la frataxine bactérienne s'auto-assemble en présence d'un excès de fer. Par conséquent, l'ensemble de ces études suggère que contrairement à la frataxine humaine, les frataxines

bactériennes CyaY et de levure Yfh1, sont capables de s'auto-assembler en présence d'un excès de fer. Cependant, il est difficile d'envisager que des protéines aussi bien conservées, tant au niveau de leurs séquences d'acides aminés que de leurs structures, puissent avoir des fonctions aussi différentes.

A la suite de ces études, le rôle de la frataxine comme protéine de stockage du fer a été remis en question par plusieurs équipes (Adinolfi *et al.* 2002; Aloria *et al.* 2004; Seguin *et al.* 2010). Tout d'abord, les oligomères Yfh1-Fe se désassemblent en présence d'autres ions tels Ca^{2+} ou Mg^{2+}. Ces résultats suggèrent donc qu'*in vivo*, la forme monomérique de la protéine est favorisée (Adinolfi *et al.* 2002). Deuxièmement, l'expression d'un mutant de la frataxine incapable d'oligomériser en présence d'un excès de fer (D86A/E90A/E93A) permet de restaurer, dans les mêmes proportions, la croissance d'une souche délétée pour le gène codant Yfh1 (Δ*yfh1*), ce qui indique que l'oligomérisation de la frataxine n'est pas une fonction essentielle, au moins chez *S. cerevisiae* (Aloria *et al.* 2004). Enfin, une troisième étude a démontré que l'expression de la protéine Yfh1 dans une souche Δ*yfh1* ne permet pas de reverser l'accumulation de fer, ce qui va à l'encontre du rôle d'Yfh1 dans le stockage du fer, bien qu'il soit possible d'imaginer que l'accumulation de fer soit un processus irréversible (Seguin *et al.* 2010). Ainsi, l'ensemble de ces résultats semblent indiquer qu'Yfh1 n'est pas une protéine « ferritine-like ». Le processus d'oligomérisation de la frataxine a été décrit *in vitro*, mais probablement que cet assemblage est inexistant, ou mineur, *in vivo*.

C . 3 . 2 . La frataxine et la biogenèse des centres Fe/S

En 2001, parallèlement aux travaux de G. Isaya et de ses collaborateurs, une étude a montré qu'il existe un lien phylogénétique entre la frataxine et les protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S (Huynen *et al.* 2001), suggérant que la frataxine est un acteur de ce processus.

Au début des années 2000, en mesurant l'activité de protéines Fe/S mitochondriales comme l'aconitase (Aco1) ou la succinate déshydrogénase (SDH), plusieurs groupes ont mis en évidence qu'un défaut d'expression de la frataxine dans les modèles eucaryotes induit un défaut dans le processus de biogenèse des centres Fe/S (Chen *et al.* 2002; Duby *et al.* 2002; Muhlenhoff *et al.* 2002). L'équipe d'Hélène Puccio a montré dans un modèle souris FRDA que le défaut de synthèse des centres Fe/S survient avant l'accumulation de fer. Ces résultats

suggèrent que le déficit de biogenèse des centres Fe/S est un événement primaire et que l'accumulation de fer est une conséquence de ce défaut. Bien que le mécanisme conduisant à l'accumulation de fer ne soit pas connu, différentes observations soutiennent cette hypothèse. Notamment, l'accumulation de fer dans la mitochondrie semble être un phénomène général corrélé à un défaut d'expression des protéines mitochondriales impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S telles que Nfs1, Isu1, Isa1 et 2, Grx5, Ssq1, Jac1, Atm1, Yah1 (Fdx), Arh1 (FdxR) ou encore Nfu1 (*S. cerevisiae*), ce qui suggère que l'accumulation de fer est une conséquence direct d'un défaut de biosynthèse des centres Fe/S (Tamarit *et al.* 2003). De plus, de nombreuses études réalisées par différentes équipes, ont montré une interaction spécifique de la frataxine avec les composants de la machinerie de biogenèse des centres Fe/S, ce qui soutient l'hypothèse d'un rôle direct de la frataxine dans la biogenèse des centres Fe/S.

Une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale), corrélée à un défaut d'incorporation du fer dans la protoporphyrine IX lors de la synthèse de l'hème, a également été observée chez les patients FRDA suggérant que la frataxine est impliquée dans l'incorporation du fer dans l'hème (Schoenfeld *et al.* 2005). Cependant, cette hypothèse est controversée car aucun défaut de synthèse de l'hème n'a été observé dans d'autres modèles, comme *S. cerevisiae* (Muhlenhoff *et al.* 2002). De plus, les patients FRDA ne souffrent pas d'anémie, qui est une conséquence attendue d'un défaut de synthèse de l'hème. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que FXN est impliquée dans la biosynthèse des centres Fe/S et que l'accumulation de fer est potentiellement une conséquence de ce défaut d'assemblage des centres Fe/S. L'une des hypothèses qui a été formulée à la suite de ces résultats et qui permettrait d'expliquer les observations faites sur la fixation du fer, avance un rôle de la frataxine comme chaperonne à fer pour la biogenèse des centres Fe/S.

C . 3 . 2 . 1 . La frataxine comme une chaperonne à fer ?

Il a été montré, par des expériences de RMN, que les protéines Yfh1 et CyaY sont capables de lier deux atomes de fer sans que cela n'entraine de processus d'oligomérisation. Les sites de fixation de ces atomes de fer ont été localisés dans une zone correspondant au domaine acide de la protéine, riche en aspartate et en glutamate (He *et al.* 2004; Nair *et al.* 2004; Cook *et al.* 2006) (**Figure I. 19**, **B**). Même si la nature des ligands et la localisation

exacte des sites de fixation n'ont pas été déterminées, il semble que les atomes de fer soient hexacoordonnés par des ligands de type N/O dans une géométrie octaédrique (Cook *et al.* 2006). Les constantes de dissociation (K_D) des deux sites de fixation du fer ont été calculées par des expériences d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) et des valeurs de 2,0 et 3,0 µM ont été rapportées (Cook *et al.* 2006). Sur la base de ces résultats, il a été proposé un rôle de chaperonne à fer pour la frataxine permettant l'apport de fer pour la biogenèse des centres Fe/S et la synthèse de l'hème dans la levure (Lesuisse *et al.* 2003; Park *et al.* 2003; Layer *et al.* 2006; Foury *et al.* 2007).

Il semble que la frataxine intervienne également dans le processus de réparation du centre Fe/S de l'aconitase mitochondriale (Bulteau *et al.* 2004), et qu'elle soit la source de fer pour la réparation des centres Fe/S lors d'un stress oxydant (Ding *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la frataxine est une chaperonne à fer intervenant dans l'assemblage des centres Fe/S, l'incorporation du fer dans la ferrochélatase et la réparation des centres Fe/S. Cependant, il faut noter que chez les mammifères, la ferrochélatase possède un centre [2Fe-2S]. Le défaut de biosynthèse de l'hème pourrait donc être relié à un défaut initial de biogenèse des centres Fe/S, ce qui laisse supposer un rôle de la frataxine dédié aux centres Fe/S (biogenèse et réparation).

C . 3 . 2 . 2 . Spécificité de la frataxine pour la machinerie ISC

Alors que des interactions protéine-protéine entre CyaY et deux composants de la machinerie ISC, IscS et IscU, ont été mises en évidence (Prischi *et al.* 2010); aucune interaction avec des composants de la machinerie SUF ou CSD n'a été observée à ce jour (Layer *et al.* 2006). Les constantes de dissociation des complexes IscS/IscU, IscS/CyaY et IscS-IscU/CyaY ont été calculées et les valeurs respectives de 1,3 µM, 18,5 µM et 35 nM ont été déterminées. Ces résultats indiquent que l'affinité de CyaY pour IscS augmente lorsqu'IscU est fixée à IscS. Les études RMN ont montré que CyaY interagit avec IscS par l'intermédiaire de son domaine acide tandis que l'interaction avec IscU est localisée au niveau des feuillets β, contenant notamment le tryptophane W61, correspondant au tryptophane W155 chez l'homme, muté chez certains patients FRDA (Prischi *et al.* 2010). Parallèlement, des analyses par spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) et par modélisation, indiquent que le complexe IscS-IscU-CyaY se structure sous forme d'un homotrimère de

type $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, où CyaY se positionne entre la cavité délimitée par l'interface du dimère d'IscS et le domaine de fixation d'IscU (**Figure I. 22**).

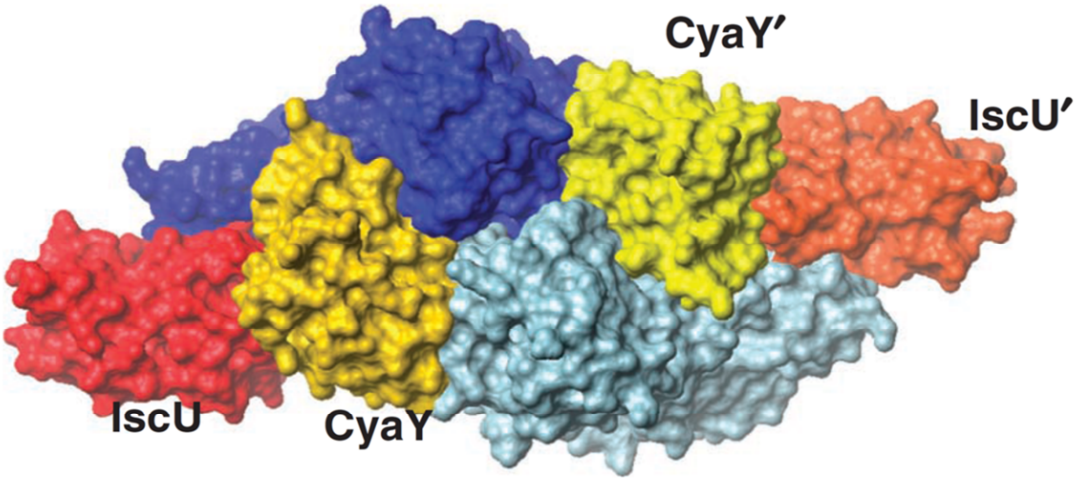


Figure I. 22. Structure du complexe IscS-IscU-CyaY. Représentation en surface du complexe IscS-IscU-CyaY obtenu par Prischi *et al.* Les protéines IscS sont colorées en bleu et cyan, les protéines IscU en rouge et orange et les protéines CyaY en jaune et en or. Image de (Prischi *et al.* 2010).

Plusieurs équipes ont montré des interactions protéine-protéine, entre les protéines eucaryotes FXN et le complexe NFS1-ISD11-ISCU, proches de celles décrites pour le système bactérien (Gerber *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2010; Schmucker *et al.* 2011; Colin *et al.* 2013). De plus, des expériences de pull-down ont montré que le fer stimule l'assemblage du complexe NFS1-ISD11-ISCU-FXN (Gerber *et al.* 2003), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par les études *in vitro* à l'aide des protéines purifiées (Tsai *et al.* 2010; Schmucker *et al.* 2011; Colin *et al.* 2013). Enfin, une analyse par spectrométrie de masse en condition douce a permis l'identification d'un complexe NFS1-ISD11-ISCU-FXN dont la stœchiométrie serait compatible avec une forme $\alpha_2\beta_{2\text{-}4}\gamma_2\delta_2$ (Colin *et al.* 2013).

C . 3 . 2 . 2 . 1 . Deux fonctions différentes pour FXN et CyaY

Chez les procaryotes, un défaut de synthèse de la protéine CyaY n'entraine ni accumulation de fer dans la bactérie ni sensibilité au stress oxydant (Li *et al.* 1999) ; un phénotype très différent de celui que nous avons décrit tout au long de cette partie chez les eucaryotes (levure et mammifères).

Les premières études biochimiques de reconstitution de centres Fe/S avec un système purifié ont montré qu'en présence de CyaY, l'assemblage des centres Fe/S est ralenti et que le ratio de centres [2Fe-2S] par rapport aux centres [4Fe-4S] n'est pas altéré (Adinolfi *et al.* 2009; Iannuzzi *et al.* 2011). Ces résultats suggèrent que la protéine CyaY agit comme un inhibiteur de la biogenèse des centres Fe/S. Le groupe d'A. Pastore a proposé que CyaY régule la production des centres Fe/S lors d'un excès de fer afin d'éviter une surproduction par rapport aux capacités d'incorporation de ces centres Fe/S dans les protéines réceptrices, qui conduirait *in fine* à des réactions de Fenton, entrainant la précipitation de fer. Cependant, ces résultats ne semblent pas en accord avec l'absence de phénotype des souches Δ*cyay* d'*E. coli*, mais pourraient expliquer l'accumulation de fer, la sensibilité au stress oxydant et la diminution de l'activité des protéines Fe/S chez les patients FRDA. Chez *E. coli,* il est possible que le système SUF prenne le relais en absence de CyaY ce qui expliquerait l'absence de phénotype dans ces souches (Li *et al.* 1999).

De manière surprenante, les cinétiques de reconstitution réalisées avec le système eucaryote purifié montrent clairement que FXN stimule l'assemblage des centres Fe/S sur la protéine ISCU (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013). L'analyse des centres Fe/S synthétisés sur ISCU montre également que la quasi-totalité des centres Fe/S formés avec FXN sont des centres [4Fe-4S], tandis qu'en absence de FXN il y a quasiment autant de centres [2Fe-2S] que de centres [4Fe-4S] (Colin *et al.* 2013). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que FXN est un activateur de la biogenèse des centres Fe/S et qu'elle favorise la formation des centres [4Fe-4S].

Ainsi, les résultats obtenus avec les systèmes eucaryotes et procaryotes sont diamétralement opposés. Afin de mieux comprendre l'origine de ces différences des études ont été réalisées en combinant les protéines eucaryotes et procaryotes (Bridwell-Rabb *et al.* 2012). Les résultats indiquent que CyaY stimule l'assemblage des centres Fe/S avec le système eucaryote NFS1-ISD11-ISCU et que FXN inhibe l'assemblage des centres Fe/S avec le système procaryote IscS-IscU. Seule la nature de la cystéine désulfurase (NFS1 ou IscS) semble avoir une influence sur la cinétique d'assemblage indépendamment de l'origine de la protéine d'échafaudage (IscU ou ISCU) ou de la frataxine (CyaY ou FXN). Enfin, il a été montré que CyaY peut complémenter une souche de levure *Δyfh1* (Bedekovics *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats suggère donc que CyaY et Yfh1 sont des homologues

fonctionnels et que selon la nature de la cystéine désulfurase elles activent ou inhibent la synthèse des centres Fe/S.

C . 3 . 2 . 2 . 2 . La frataxine comme activateur de la formation d'ions sulfures ?

Les expériences les plus récentes, réalisées avec le système mammifère NFS1-ISD11-ISCU-FXN purifié, montrent que la protéine ISCU diminue l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 et que FXN stimule l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11-ISCU (Tsai *et al.* 2010). Par contre, FXN n'a aucun effet sur le complexe NFS1-ISD11 en absence d'ISCU. Ces résultats ont été confirmés par Colin *et al.* (Colin *et al.* 2013). Bien que l'existence d'un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU n'ait pas été démontrée, les auteurs de ces études ont proposé que FXN positionne la cystéine catalytique de NFS1 à proximité d'une des cystéines d'ISCU afin de favoriser le transfert ou que FXN stimule la formation de persulfures sur NFS1. Les métaux semblent également avoir une influence sur l'activité cystéine désulfurase; mais des résultats contradictoires ont été obtenus, alors que l'équipe de David Barondeau observe une stimulation en présence des ions Fe^{2+} et Mn^{2+}, l'équipe de Sandrine Ollagnier-de-Choudens observe également un effet activateur avec les ions Fe^{3+} et Mg^{2+}. Ce dernier groupe a également montré que la fixation du fer, dans le complexe NFS1-ISD11-ISCU est stimulée en présence de FXN lorsque NFS1 produit des ions sulfures (Colin *et al.* 2013). Sur la base de ces observations, il a été proposé que FXN stimule l'entrée du fer dans le complexe NFS1-ISD11-ISCU, ce qui serait en accord avec un rôle de chaperonne à fer. Cependant ces résultats pourraient également être expliqués par le fait que le complexe NFS1-ISD11-ISCU-FXN en présence de L-cystéine, de fer et de DTT, forme des centres Fe/S. En résumé, l'ensemble de ces résultats suggère que FXN stimule la production d'ions sulfures, et par conséquent l'assemblage des centres Fe/S.

Plus récemment, des investigations menées chez *S. cerevisiae* par les équipes d'Andrew Dancis et Debkumar Pain ont permis de suivre *in cellulo* la formation de persulfures sur Nfs1 par radio-marquage à l'aide de L-cystéine-[^{35}S]. Les résultats de ces expériences montrent une quantité de protéine Nfs1 persulfurée plus importante en présence d'Yfh1 qu'en son absence. Ces résultats suggèrent donc qu'Yfh1 stimule la formation du persulfure sur Nfs1 (Pandey *et al.* 2013). Cependant, contrairement à ce qu'il avait été observé précédemment avec les protéines de mammifères, cette stimulation ne dépend pas de

la présence d'Isu1 (Pandey *et al.* 2013). Sur la base d'expériences réalisées en conditions dénaturantes et non dénaturantes, afin de suivre la fixation de la L-cystéine au complexe, un mécanisme a été proposé dans lequel Yfh1 stimulerait l'activité cystéine désulfurase en augmentant l'affinité de la L-cystéine pour Nfs1 (Pandey *et al.* 2013).

Enfin, cette même équipe a identifié un mutant ponctuel d'Isu1 portant sur la méthionine M107 (M107I) qui est capable de restaurer la croissance d'une souche Δ*yfh1* (Yoon *et al.* 2012; Yoon *et al.* 2014). Ces résultats indiquent qu'il existe un lien fonctionnel entre Isu1 et Yfh1, puisqu'une mutation ponctuelle sur Isu1 permet de remplacer le rôle de la frataxine. Cet effet est potentiellement lié aux effets inverses d'ISCU et de FXN sur l'activité cystéine désulfurase de NFS1 mammifère. Il est intéressant de remarquer que la méthionine M107 d'Isu1 est conservée chez les eucaryotes, alors que chez les procaryotes, elle est majoritairement remplacée par une isoleucine, suggérant que la machinerie ISC bactérienne s'affranchit de la nécessité de CyaY grâce à cette différence.

En conclusion, il semble établit que FXN stimule la biogenèse des centres Fe/S chez les eucaryotes en activant la production des ions sulfures (S^{2-}). Cependant, les résultats exposés dans cette introduction ne permettent pas d'établir un mécanisme clair pour expliquer la stimulation de la production des ions S^{2-}. Il est proposé aujourd'hui que FXN active la formation du persulfure de NFS1, ce qui favoriserait le transfert de soufre de NFS1 à ISCU.

D . Mon projet de thèse

Mon projet de recherche a pour principal objectif une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse des centres Fe/S chez les eucaryotes ; et notamment de préciser le rôle de la frataxine dans ce processus.

Nous avons cherché à comprendre par quel mécanisme la frataxine est capable de stimuler la production d'ions sulfures. Pour cela nous avons étudié les réactions élémentaires du cycle catalytique de l'enzyme, c'est-à-dire la formation et la réduction du persulfure de NFS1. Nous avons également cherché à caractériser un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, ce qui n'avait pas encore été montré au commencement de ce projet. Pour cela, nous avons reconstitué *in vitro* la machinerie ISC de biogenèse des centres Fe/S à partir des protéines NFS1, ISD11, ISCU et frataxine (FXN) purifiées. Nous avons ensuite développé un

nouveau type de test de détection et de quantification des persulfures dans une protéine, basé sur l'alkylation des thiols par des composés peptides-maléimides, afin de déterminer les effets des protéines FXN et d'ISCU sur les cinétiques de formation et de réduction des persulfures dans ce complexe multi-protéiques. Nous avons cherché à identifier un réducteur physiologique des persulfures et nous avons cherché à établir des corrélations entre les effets de FXN et d'ISCU sur les réactions de formation et de réduction de ces persulfures au cours de la reconstitution de centres Fe/S.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

A . Matériels biologiques

A . 1 . Système de surexpression bactérien : souche *Escherichia Coli* Rosetta2 (DE3)

Nous avons utilisé les bactéries Rosetta2 (DE3) qui sont dérivées des bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3). Ces bactéries possèdent le génotype suivant : F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR). L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG). Ce système est utilisé pour surproduire des protéines en plaçant le gène sous contrôle d'un promoteur T7. Les bactéries Rosetta2 ont la particularité d'augmenter l'expression des protéines eucaryotes qui comportent des codons rares. Les gènes codants pour les protéines eucaryotes contiennent un certain nombre de codons sous-représentés dans les génomes bactériens, appelés codons rares. Par conséquent les ARN de transfert correspondant sont également peu ou pas exprimés dans les souches bactériennes. La souche Rosetta2 possède les ARN de transfert correspondant à 7 codons rares (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC et CGG) encodés dans un plasmide portant une résistance au chloramphénicol (pRARE2 (Cam^R)).

A . 2 . Vecteurs de surexpression

Les plasmides pCDFDuet-1:$NFS1_{59-459}$-ISD11, qui permet d'exprimer le complexe NFS1-ISD11, pETDuet-1:$ISCU_{36-168}$ et pET-16b:FXN_{79-207}, pour l'expression des formes matures d'ISCU et de FXN nous ont été fournis par l'équipe d'Hélène PUCCIO (IGBMC, Strasbourg).

	Vecteur	Résistance	Séquence codante (Protéine)	Séquence protéique	Mutation	Etiquette	Clivage	Site de restriction	Annexe
pCDFDuet His-Thr-NFS1-ISD11	pCDFDuet-1	Spectinomycine	1) NFS1 (souris)	59-459		6 His (N-ter)	Thrombine	[NcoI-XhoI]	2
			2) ISD11 (souris)	1-91				[Nde1- BgIII]	3
pETDuet His-Thr-ISCU	pETDuet-1	Ampicilline	ISCU (souris)	36-168		6 His (N-ter)	Thrombine	[NcoI-EcoRI]	4
pETDuet His-Thr-ISCU^{C35S}			ISCU C35S (souris)		C35S	6 His (N-ter)	Thrombine		
pETDuet His-Thr-ISCU^{C61S}			ISCU C61S (souris)		C61S	6 His (N-ter)	Thrombine		
pETDuet His-Thr-ISCU^{C104S}			ISCU C104S (souris)		C104S	6 His (N-ter)	Thrombine		
pETDuet His-Thr-ISCU^{C104G}			ISCU C104G (souris)		C104G	6 His (N-ter)	Thrombine		
pETDuet His-Thr-ISCU^{M106I}			ISCU M106I (souris)		M106I	6 His (N-ter)	Thrombine		
pET-16b His-Thr-FXN	pET-16b	Ampicilline	FXN (souris)	79-207		6 His (N-ter)	Thrombine	[NcoI-XhoI]	5
pET-16b His-Thr-FXN^{R162A}			FXN R162A (souris)		R162A	6 His (N-ter)	Thrombine		
pET-28b His-Thr-FDX2	pET-28b	Kanamycine	FDX2 (souris)	53-183		6 His (N-ter)	Thrombine	[NdeI-BamHI]	
pET-28b His-Thr-GLRX5			GLRX5 (humain)	34-157		6 His (N-ter)	Thrombine	[NcoI-NotI]	
pET-28b His-Thr-NFS1			NFS1 (souris)	33-459		6 His (N-ter)	Thrombine		

Tableau II. 1. Résumé de l'ensemble des plasmides utilisés au cours de ma thèse. Ces vecteurs ont été réalisés par Véronique Henriot et Julia Jouaret de la plateforme IMAGIF.

Ces plasmides ont servi de matrice pour introduire, en 5' de la séquence codante, une étiquette poly-histidine et un site de clivage pour la thrombine « LVPRGS », qui va permettre, par la suite, d'éliminer l'étiquette poly-histidine (**Tableau II. 1**) (Cf. **Annexe 1**). Seule la protéine ISD11 ne possède ni étiquette poly-histidine, ni site de clivage pour la thrombine, car elle est purifiée sous forme d'un complexe avec NFS1, qui contient déjà l'étiquette poly-histidine et le site de clivage. Ces plasmides ont également été utilisés pour introduire différentes mutations ponctuelles dans les protéines ISCU (C35S, C61S, C104S, C104G et M106I) et FXN (R162A).

Enfin, nous avons fait synthétiser et cloner (GenScript) une forme plus longue de NFS1 (NFS1 (33-459)) dans un vecteur pET-28, pour tenter d'exprimer une forme soluble de la protéine NFS1 en absence d'ISD11 (Cf. Chapitre III) ; ainsi que les formes matures des protéines FDX2 (souris) et GLRX5 (humain), dans ce même vecteur (**Tableau II. 1**).

A . 3 . Transformation des bactéries compétentes : Rosetta2 (DE3)

Dans un tube eppendorf stérile, 25 µL de bactéries compétentes Rosetta2 (DE3) (Novagen®) sont incubées dans la glace pendant 15 minutes en présence de 1 à 15 ng de vecteurs de surexpression. Un choc thermique de 45 secondes à 42°C, permet la transformation des bactéries. Ce traitement déstabilise la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les bactéries. Après un temps d'incubation de 5 minutes dans la glace, 175 µL de milieu LB sont ajoutés. Les 200 µL de milieu sont incubés 1 heure sous agitation à 37°C. Les bactéries sont finalement étalées sur boîte de Pétri contenant

du milieu LB-agar, additionné des antibiotiques appropriés. Les boîtes sont placées une nuit à 37°C. Les colonies présentent sont celles contenant à la fois le vecteur de surexpression et le plasmide pRARE2 (Cam^R).

B . Production des protéines

B . 1 . Le milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu de culture généralement utilisé pour la culture bactérienne : le milieu LB (Lysogeny Broth ou Luria Bertani) (Bertani 1951). Ce milieu LB est un milieu riche de culture qui contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de chlorure de sodium (NaCl).

B . 2 . Surexpression des protéines

La souche *E. Coli* Rosetta2 (DE3) est transformée par les différents plasmides présentés dans le **Tableau II. 1**. Les transformants sont sélectionnés sur un milieu LB-agar, grâce aux antibiotiques adéquats. Une colonie isolée sur boîte de Pétri est mise en culture dans 100 mL de milieu LB additionné des antibiotiques appropriés. Cette préculture incube une nuit sous agitation (180 rpm) à 37°C, avant de servir à inoculer 2 L de milieu LB (Densité optique à 600nm ≈ 0.1). La culture se poursuit sous agitation (180 rpm) à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} égale à 0,6, où l'expression des protéines est induite par l'ajout d'une solution d'IPTG (500µM final). La culture bactérienne reste sous agitation (180 rpm) toute la nuit à 18°C, avant d'être centrifugée à 5 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Enfin, les culots bactériens obtenus sont remis en suspension dans le tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8), contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma).

B . 3 . Extraction

Les culots bactériens, remis en suspension dans le tampon A (+ inhibiteurs de protéases), sont traités par 4 à 6 cycles de presse de French (**Annexe 6**). Cette méthode utilise des variations de pressions en forçant les cellules à passer à travers une buse très étroite. Au moment de l'expulsion, la dépression est telle que les cellules éclatent. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 45 000 rpm pendant 1 heure et à 4°C. Le surnageant, appelé l'extrait brut, contient les protéines solubles et le culot contient les protéines insolubles et les débris cellulaires. Afin de vérifier le bon déroulement de l'extraction des protéines, ces deux fractions sont analysées par SDS-PAGE.

B . 4 . Purification des protéines

L'ensemble des étapes de purification par chromatographie présentées ci-dessous ont été réalisées à l'aide d'un appareil AKTA (GE Healthcare). Cet appareil permet d'automatiser le chargement des échantillons sur les colonnes de chromatographie, leur élution et leur fractionnement en sortie de colonne. Nous avons suivi l'absorbance à 280 nm pour détecter les protéines et à 410 nm pour le cofacteur PLP de NFS1.

Le complexe NFS1-ISD11 et les protéines ISCU, FXN, GLRX5 et FDX2 ont été purifiées en quatre étapes par des protocoles similaires.

B . 4 . 1 . Chromatographie d'affinité

Cette étape de chromatographie d'affinité sur colonne de nickel permet l'enrichissement des extraits bruts en protéines possédant une étiquette poly-histidine, qui s'accroche spécifiquement à la colonne (**Annexe 7**). Les protéines sont ensuite éluées avec de l'imidazole, qui est un compétiteur de l'histidine pour l'interaction avec le nickel. Afin de limiter, la fixation de ces protéines, le tampon de charge contient 5 mM d'imidazole et 150 mM de sel afin de dissocier les interactions polaires.

L'extrait brut de protéines est chargé sur une colonne de nickel (HiTrap Chelating HP 5mL, GE Healthcare) équilibrée avec du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8). Après un lavage de la colonne avec le tampon A, jusqu'au retour de l'absorbance à sa valeur initiale, les protéines sont éluées grâce à un gradient linéaire d'imidazole réalisé à l'aide du tampon A et d'un tampon B (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8). Les fractions, récoltées en sortie de colonne (1,5 mL) sont analysées sur un gel d'électrophorèse (noté par la suite SDS-PAGE pour Sodium DodécylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Les fractions contenant les protéines d'intérêt sont récupérées et concentrées sur Amicon® Ultra (MILLIPORE) jusqu'à un volume final de 4 mL. Selon la porosité de leurs membranes, appelées « membrane molecular weight cut off (MWCO) », les Amicons laissent passer des molécules de différentes tailles. Nous avons utilisés des MWCO de 30 kDa pour le complexe NFS1-ISD11 et 3 kDa pour les autres protéines.

B . 4 . 2 . Désalage des protéines

L'imidazole, qui interfère avec l'étape suivante de clivage à la thrombine, est éliminé par désalage des protéines semi-purifiées sur une colonne HiPrepTM 26/10 Desalting (GE Healthcare, 2.6 cm*10 cm, 53 mL), équilibrée avec le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8). Ce type de colonne permet de séparer les protéines et les petites molécules (sels, imidazole,…). Le principe est le même que celui d'une chromatographie d'exclusion de taille mais dans une gamme de poids moléculaires très différente (**Annexe 8**). Les fractions, récoltées en sortie de colonne, sont regroupées et concentrées sur Amicon® Ultra, jusqu'à un volume final d'environ 1 à 1,5 mL.

B . 4 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine

Le clivage par la thrombine va permettre d'éliminer l'étiquette poly-histidine par coupure de la liaison peptidique entre l'arginine et la glycine de sa séquence spécifique « LVPRGS » ; laissant ainsi 2 acides aminés (glycine et sérine) en N-terminal des protéines (**Annexe 9**). Les 1 mL des extraits protéiques sont traités avec 3,5 NIH unit de thrombine par mg de protéines, 16 heures à 22°C et sous agitation (550 rpm). Le clivage de l'étiquette poly-

histidine est confirmé par SDS-PAGE. Pour finir, les étiquettes poly-histidines et la trypsine, qui possède aussi une étiquette poly-histidine, sont éliminées par purification sur colonne de nickel. Les protéines d'intérêt qui n'ont plus d'étiquette poly-histidine ne sont pas retenues sur la colonne et sont directement éluées et récupérées au moment de la charge des échantillons.

B . 4 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique

Cette étape de purification consiste à réaliser un tamisage moléculaire, où les différents constituants de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs volumes hydrodynamiques, qui dépend de la taille et du repliement des protéines (**Annexe 8**).

Nous avons constaté que nos préparations du complexe NFS1-ISD11 et d'ISCU contenaient une certaine quantité de forme persulfurée des protéines, formée au cours de la culture bactérienne (Cf. chapitre III). Les extraits protéiques contenant le complexe NFS1-ISD11 et la protéine ISCU (WT et mutants) ont donc été traités par du DTT (Diothiothréitol, 10mM final) pendant10 minutes et à 25°C, afin d'éliminer ces persulfures avant la dernière étape de purification, qui permettra d'éliminer le DTT en excès. Les extraits sont ensuite dilués dans du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8) jusqu'à un volume final de 4 mL et sont chargés sur une colonne HiLoad^{TM} 16/60 Superdex^{TM} prep-grade (GE Healthcare, 200 pour NFS1-ISD11 et 75 pour les autres protéines) équilibrée avec le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8). L'élution des protéines d'intérêt se fait avec ce même tampon C, à un débit de 1 mL/min. Des fractions de 1 mL sont récoltées et analysées par SDS-PAGE.

Le complexe NFS1-ISD11 est élué à 66 mL et les protéines ISCU, ISCU^{C35S}, ISCU^{C61S}, ISCU^{C104S}, ISCU^{C104G}, ISCU^{M106I}, FXN, FXN^{R162A}, GLRX5 (apo) et FDX2 éluent vers 73-74 mL. Les fractions qui contiennent les protéines d'intérêt pures sont récupérées, concentrées sur Amicon® Ultra, aliquotées par 100 µL avec du glycérol (10 % v/v) et stockées à -80°C.

C . Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par deux méthodes différentes : par la méthode de Bradford et par UV-visible à l'aide de coefficients d'extinction molaire déterminés de manière empirique. Ces deux méthodes présentant des limitations, nous avons comparé les résultats obtenus par chaque méthode.

C . 1 . Méthode de Bradford

La méthode de Bradford (Bradford 1976) est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie en se fixant aux protéines, qui présente un maximum d'absorbance à 595 nm (« Biorad Protein Assay » BioRad). Une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, bovin serum albumin) à 2 µg/µL. La principale limitation de ce test est qu'il est sensible à la structure globulaire ou non des protéines. Nous avons utilisé la BSA comme protéine de référence qui est une protéine globulaire, étant donné que ni le complexe NFS1-ISD11, ni ISCU ou FXN ne sont purement globulaires (Cf. Chapitre d'introduction), ce test introduit probablement une certaine incertitude.

C . 2 . Absorption à 280 nm

Les protéines sont également dosées par UV-visible à l'aide d'un coefficient d'extinction molaire (ε), qui dépend presque exclusivement du nombre de résidus aromatiques contenus dans une protéine. Ce coefficient est généralement calculé en considérant les coefficients d'extinction molaire connus de chaque acide aminé aromatique pris de manière isolé (**Tableau II. 2**). La principale limitation de cette méthode est qu'elle ne tient pas compte de l'environnement spécifique de chaque acide aminé au sein de la protéine qui peut modifier les propriétés d'absorption de chaque acide aminé.

	ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	Références
NFS1	38 850	Expasy
ISD11	7 450	Expasy
NFS1-(2) ISD11	53 750	Expasy
NFS1-(3) ISD11	61 200	Expasy
PLP	10 900	Marelja *et al*., **2008**
ISCU	8 250	Expasy
FXN	26 030	Expasy

Tableau II. 2. Coefficients d'extinction molaire de chacune des protéines étudiées au cours de ma thèse et leurs références.

Le maximum d'absorbance à 280 nm est corrélé à la concentration de la protéine grâce à la formule de Beer-Lambert:

$$\mathcal{A} = \varepsilon \, . \, c \, . \, l$$

Où, $\mathcal{A}$ est l'absorbance (sans unité de mesure), ε, le coefficient d'extinction molaire (en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$), c, la concentration de la protéine (en $mol.L^{-1}$) et l, la longueur de la cuve de mesure (en cm).

Pour le complexe NFS1-ISD11, la détermination de la masse exacte du complexe NFS-ISD11-ISCU-FXN avait conduit à un rapport (NFS1:ISD11) de (1:2) (Colin *et al.* 2013). Nos quantifications des bandes sur les gels d'électrophorèse suggèrent un rapport (NFS1:ISD11) de (1:3). En utilisant cette stœchiométrie pour déterminer le coefficient d'extinction molaire du complexe NFS1-ISD11 (**Tableau II. 2**, 61200 $M^{-1}.cm^{-1}$), nous avons trouvé un meilleur accord entre la détermination par la technique Bradford et l'absorbance à 280 nm. Nous avons choisi d'utiliser le coefficient d'extinction molaire correspondant à une stœchiométrie (1:3) sachant que la différence avec le coefficient d'extinction molaire correspondant à une stœchiométrie (1:2) représente un écart de 10% sur la détermination de la concentration du complexe.

D . Etude de la formation des complexes ternaires et quaternaires

D . 1 . Etude de la formation des complexes par gel natif

D . 1 . 1 . Principe du gel natif

Afin de caractériser la présence de complexes multimériques, les échantillons ont été analysés par électrophorèse en conditions natives ; c'est-à-dire sans SDS. Les protéines vont donc migrer en fonction de leur charge, de leur poids moléculaire et de leur structure tridimensionnelle (Cf. **Annexe 10** pour la composition des gels et tampons).

D . 1 . 2 . Protocole

Un mélange protéique contenant 25 µM de complexe NFS1-ISD11 et/ou un ou trois équivalents d'ISCU et/ou de FXN, en présence ou non de 10 mM de DTT, est réalisé dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8), pour un volume final de 35 µL. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est analysé en gel natif. La migration des protéines se fait à 5°C (cuve dans la glace et en chambre froide) pendant environ 1h30 à 50 V (gel de concentration) puis 3h30 à 90 V (gel de séparation).

D . 2 . Etude de la formation des complexes par réaction de couplage

Lors de cette étude, nous avons comparé quatre agents de couplage (ou crosslinkers) différents : le DST (disuccinimidyl tartrate), le DSS (disuccinimidyl sulerate), le sulfo-MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester) et le sulfo-MSCC (sulfosuccinimidyl-4-[N-maléimidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate).

D . 2 . 1 . Préparation de la solution de DST (ou DSS)

Le DST ou le DSS, contrairement au sulfo-MSCC et au sulfo-MBS, sont solubles dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou le DMF (diméthylformamide). Le DMSO et le DMF, pouvant potentiellement avoir un effet dissociant sur les complexes, nous avons donc limité leurs concentrations finales à 1%. Pour cela, une solution mère de DST (ou de DSS) à 1 M dans le DMSO (ou DMF) est réalisée, suivi d'une solution intermédiaire dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) pour obtenir une concentration finale de 5 % en DMSO. Cette solution intermédiaire sera ensuite utilisée pour ajouter le DST au milieu réactionnel afin d'obtenir 1 % final en DMSO.

D . 2 . 2 . Protocole

Le complexe NFS1-ISD11 (20µM) avec un équivalent d'ISCU et/ou de FXN est incubé à 25°C dans du tampon C. La réaction de crosslink est initiée par l'ajout d'une concentration finale de 20 mM d'agents de crosslink (1% DMSO final pour le DST et DSS). Après 30 minutes à 25°C et 550 rpm, la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de tris (Trishydroxyméthylaminométhane à 60 mM et pH 7), qui possède une amine primaire capable de réagir avec les groupements NHS ester des crosslinkers et de désactiver la réaction. Le mélange réactionnel est laissé à incuber 15 minutes à 25°C sous agitation à 550 rpm. Chaque échantillon est analysé par SDS-PAGE 14 % (Cf. **Annexe 11**).

D . 3 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité

Différents mélanges protéiques et différentes conditions ont été testés et analysés par chromatographie d'affinité. La formation des complexes a été analysée en utilisant une colonne de nickel. Nous avons tiré avantage de l'étiquette poly-histidine de NFS1 pour servir d'appât lors de la formation des complexes ternaires et quaternaires.

Le complexe NFS1-ISD11 (45 µM), avec 2,5 équivalents d'ISCU et 5 équivalents de FXN a été incubé dans du tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) à 25°C, puis

injecté sur colonne de nickel (5 mL), préalablement équilibrée avec du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, la colonne est lavée avec 10 mL de tampon A et les protéines sont éluées avec 10 mL de tampon D (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8,0).

Pour tester l'influence de la concentration d'imidazole, de fer et de L-cystéine, le complexe NFS1-ISD11 (10 µM) et 2 équivalents d'ISCU et de FXN, en présence ou non de 300 µM de L-cystéine ou de 20 µM d'une solution de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, a été incubé dans du tampon E (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 800 µM imidazole, pH 8,0). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 250 µL de mélange sont injectés sur la colonne de nickel (1mL), préalablement équilibrée avec le tampon E. Après un lavage de la colonne avec 6 mL de tampon E, les protéines sont éluées à l'aide du tampon F (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8,0).

Enfin, les protéines sorties de la colonne lors des phases de lavage et d'élution, sont récoltées ($V_{fraction}$ = 0,5 mL) et analysées par SDS-PAGE 14 % et western blot (Cf. **Annexe 12** pour la composition des tampons).

D . 4 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'exclusion stérique

Pour l'étude de la formation des complexes ternaires, 20 µM du complexe NFS1-ISD11 avec 20 µM d'ISCU (WT et mutants) sont incubés 5 minutes à 25°C dans du tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8). Pour l'étude des complexes quaternaires et du complexe NIF, 100 µM de NFS1-ISD11 avec 500 µM de FXN, en présence ou non de 200 µM d'ISCU (WT et mutants) sont incubés 5 minutes à 25°C dans du tampon C. Les 250 µL de ce mélange sont injectés sur une colonne Superdex 200 10/300 (dite analytique) et les protéines sont éluées avec du tampon C, à un débit de 0,8 mL/min. Les éluats récoltés ($V_{fraction}$ = 0,5 mL) sont analysés par SDS-PAGE 14 %.

E . Test d'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

E . 1 . Cinétique de formation des persulfures

Le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) est incubé à 25°C dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) en présence d'un équivalent d'ISCU (WT et mutants) et/ou de FXN (WT et mutants). La réaction commence lors de l'ajout de L-cystéine (20 équivalents). La cinétique est réalisée par prélèvement de 10 µL du mélange réactionnel et la réaction est stoppée par 1,5 équivalents de $MalP_{16}$ par rapport à la quantité totale de thiols (comprenant les cystéines des protéines et la L-cystéine ajoutée). Afin de rendre accessibles au $MalP_{16}$ toutes les cystéines des protéines, après 3 minutes à 30°C, 2 % de SDS sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 20 minutes à 30°C et sous agitation (550 rpm). La moitié du volume réactionnel est ensuite incubée avec 1 µL de DTT à 100 mM pendant 20 minutes à 25°C. Ce traitement DTT sur les protéines alkylées va permettre de réduire les ponts disulfures des espèces « protéine-S-S-$MalP_{16}$ » formées lors l'alkylation d'une cystéine persulfurée par le $MalP_{16}$. L'autre moitié du volume réactionnel reste dans des conditions non réductrices. Chaque aliquot de réaction est déposé sur SDS-PAGE 8 % (analyse de NFS1) et 14 % (analyse d'ISCU).

Lors de l'étude comparative avec les résultats de Dancis et ses collaborateurs (Cf. Chapitre V), nous avons suivi le protocole suivant. L'expérience est réalisée dans un volume final de 200 µL contenant 50 nM du complexe NFS1-ISD11, en présence ou non d'un équivalent de FXN, incubé dans le tampon C. La réaction est initiée avec l'ajout de 2 équivalents de L-cystéine et le mélange est incubé 15 minutes à 30°C. La réaction est stoppée par 50 équivalents de $MalP_{16}$ par rapport à la quantité totale de thiols. Après 3 minutes à 30°C, le mélange est incubé avec 2 % de SDS pendant 20 minutes à 30°C. La moitié du volume réactionnel est incubée avec 1 µL de DTT à 100 mM, 20 minutes à 25°C. Tous les échantillons sont ensuite concentrés à l'aide d'un SpeedVac jusqu'à un volume compris entre 20 µL et 25 µL, et sont analysés (~ 100 ng) sur un gel SDS-PAGE 8 % en conditions réductrices et non réductrices.

E . 2 . Cinétique de réduction des persulfures

Dans un premier temps les formes totalement persulfurées de NFS1 et ISCU sont préparées en incubant le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) en présence d'un équivalent d'ISCU (WT et mutants) et/ou de FXN avec de la L-cystéine (20 équivalents) à 25°C dans du tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8). Après 3 minutes de réaction en présence de FXN et 25 minutes en absence de FXN la L-cystéine en excès est enlevée par un échange de tampon sur une colonne MicroBio-spin6 (Biorad). La réaction de réduction est initiée par ajout de 50 équivalents de DTT. La cinétique est réalisée par prélèvement de 8µL du mélange réactionnel et la réaction est stoppée par 1,5 équivalents de $MalP_{16}$ par rapport à la quantité totale de thiols. Le protocole est ensuite en tout point identique à celui décrit ci-dessus : avec l'ajout du SDS et l'obtention des échantillons dans des conditions réductrices et non-réductrices. Chaque aliquot de réaction est déposé sur SDS-PAGE 8% (analyse de NFS1) et 14% (analyse d'ISCU).

F . Test d'activité cystéine désulfurase

F . 1 . Qu'est-ce qu'une cystéine désulfurase ?

La cystéine désulfurase NFS1 est une enzyme qui réalise la désulfurisation de la L-cystéine en L-alanine et mobilise le soufre sous la forme d'un intermédiaire persulfure sur sa cystéine catalytique (**Figure II. 1**).

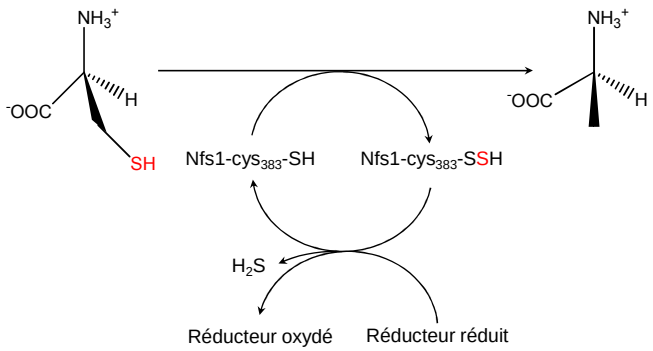


Figure II. 1. Principe de fonctionnement des cystéines désulfurases. Exemple avec la protéine NFS1, qui réalise la désulfurisation de la L-cystéine pour donner la L-alanine, formant un persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1. Ce persulfure peut être ensuite réduit libérant du soufre sous forme de H_2S et permet ainsi de revenir à la forme initiale de la protéine.

F . 2 . Protocole du test d'activité cystéine désulfurase

Le mélange réactionnel est composé de 20 µM du complexe NFS1-ISD11 en présence d'un équivalent d'ISCU (WT et mutants) et/ou de FXN, avec ou sans DTT, comme indiqué dans les légendes des figures, incubé dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) à 25°C. La réaction est initiée par ajout de 20 équivalents de L-cystéine par rapport à NFS1 et l'activité cystéine désulfurase est mesurée par dosage de la L-alanine ou des ions sulfures produits au cours la réaction.

F . 2 . 1 . Dosage du soufre

Le protocole que nous avons utilisé est inspiré de la méthode décrite par Siegel (Siegel 1965). Il est basé sur la réaction des ions sulfure (S^{2-}) avec le DMPD (diméthyl phénylène diamine) en milieu oxydant ($FeCl_3$) pour produire du bleu de méthylène et permettre un dosage colorimétrique (**Figure II. 2**).

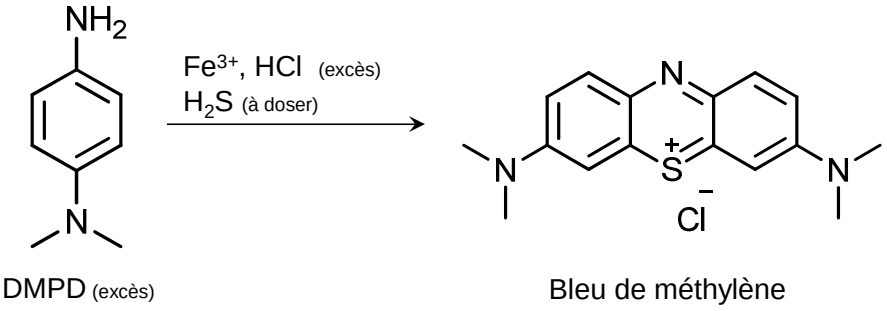


Figure II. 2. Principe du dosage des ions sulfures produit au cours du test d'activité cystéine désulfurase. Les ions sulfures (S^{2-} ou H_2S en milieu acide) réagissent avec le DMPD et le fer afin de former une molécule de bleu de méthylène, dosée par absorbance à 670 nm.

La cinétique de la réaction est suivie par prélèvement de 25 µL et la réaction est stoppée avec 125 µL de DMPD à 1% dans 5 N HCl et 50 µL de $FeCl_3$ à 115 mM dans 1,2 N HCl, qui sont ajoutés simultanément au mélange réactionnel. Le tube est refermé pour éviter le dégagement de H_2S et la solution est mélangée vigoureusement puis laissée incuber 20 minutes à température ambiante. La présence de soufre est révélée par l'apparition d'une couleur bleu correspondant à la formation du bleu de méthylène. Chaque échantillon est centrifugé 5 minutes à 14 500 rpm et le bleu de méthylène est dosé sur un spectrophotomètre

UV-visible à 670nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 30 400 $M^{-1}.cm^{-1}$, déterminé expérimentalement à partir d'une solution de Na_2S standard.

F . 2 . 2 . Dosage de l'alanine

Le protocole que nous avons utilisé est inspiré de la méthode utilisé par Colin *et al*. (Colin *et al.* 2013). Il utilise l'alanine dehydrogenase (ADH) pour doser la quantité d'alanine produite au cours de la réaction. L'alanine déshydrogénase est une enzyme qui réalise l'amination du pyruvate à partir de la L-alanine (**Figure II. 3**). Cette réaction est réversible et nécessite du NAD+ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme oxydant qui produit du NADH. La réaction peut donc être suivie par UV-visible à 340 nm qui correspond au maximum d'absorption du NADH.

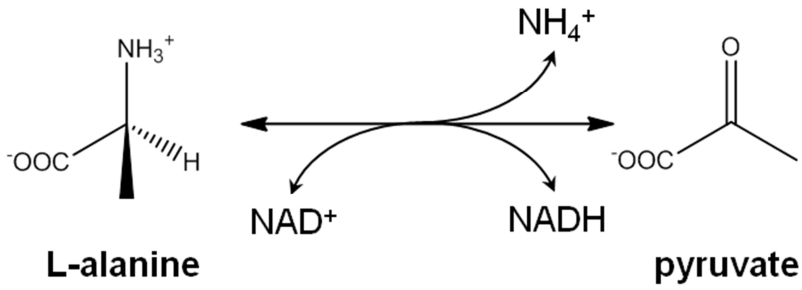


Figure II. 3. Principe de fonctionnement de l'alanine déshydrogénase (ADH).

La cinétique de la réaction est suivie par prélèvement de 10 µL à 40 µL du mélange réactionnel, de manière à pouvoir se situer au-delà de la limite de détection de notre test (~ 5 µM en L-alanine). Deux protocoles différents ont été utilisés pour stopper la réaction et déprotéiniser les échantillons (afin de limiter l'absorbance à 340 nm). Soit par dénaturation thermique, soit par précipitation en milieu acide avec l'acide trichloroacétique (TCA). Pour la dénaturation thermique, les échantillons sont placés dans un bain sec à 99°C pendant 10 minutes et le surnageant, qui contiennent la L-alanine produite au cours de la réaction, est récupéré par centrifugation 4 minutes à 14 500 rpm. Pour la précipitation au TCA, du TCA est ajouté de façon à obtenir un pH final de 2 (0,8 % de TCA final) et les protéines sont incubées pendant 5 minutes dans la glace. Les échantillons sont centrifugés 4 minutes à 14 500 rpm et le TCA présent dans le surnageant est neutralisé avec de la soude (70 mM final) afin d'obtenir un pH final de 10, correspondant au pH optimum de fonctionnement de l'alanine

déshydrogénase (ADH). Pour finir, les échantillons sont une seconde fois centrifugés 4 minutes à 14 500 rpm.

La quantité d'alanine présente dans les échantillons est mesurée dans un tampon à pH 10 contenant 50 mM $NaHCO_3$, 6 mM de NAD^+ et 0,5 unité/µL d'ADH. L'acquisition de la mesure à 340nm débute avec le tampon seul ; et après 30 secondes d'acquisition, l'échantillon est ajouté afin d'obtenir un volume final de 100 µL (tampon + échantillon). La production de NADH est suivie pendant 15 minutes (**Figure II. 4**). Afin de calculer la concentration de NADH produit, les courbes obtenues sont simulées grâce au logiciel Prism4 (GraphPad Software) selon l'équation suivante :

$$\mathbf{Abs_{340nm} = A\left(1 - e^{(-k(1-30))}\right) + B\,(t-30) + C}$$

Où A est la valeur de l'absorbance à la fin de la réaction (l'alanine a été entièrement consommée), k, la constante de vitesse de la réaction et t, le temps en secondes. Le terme « B(t-30) » correspond à la valeur de l'absorbance au début de la réaction (t = 30s) et C, est une constante qui tient compte d'une dérive linéaire de l'absorbance à 340nm qui ne correspond pas à la formation de NADH par l'ADH.

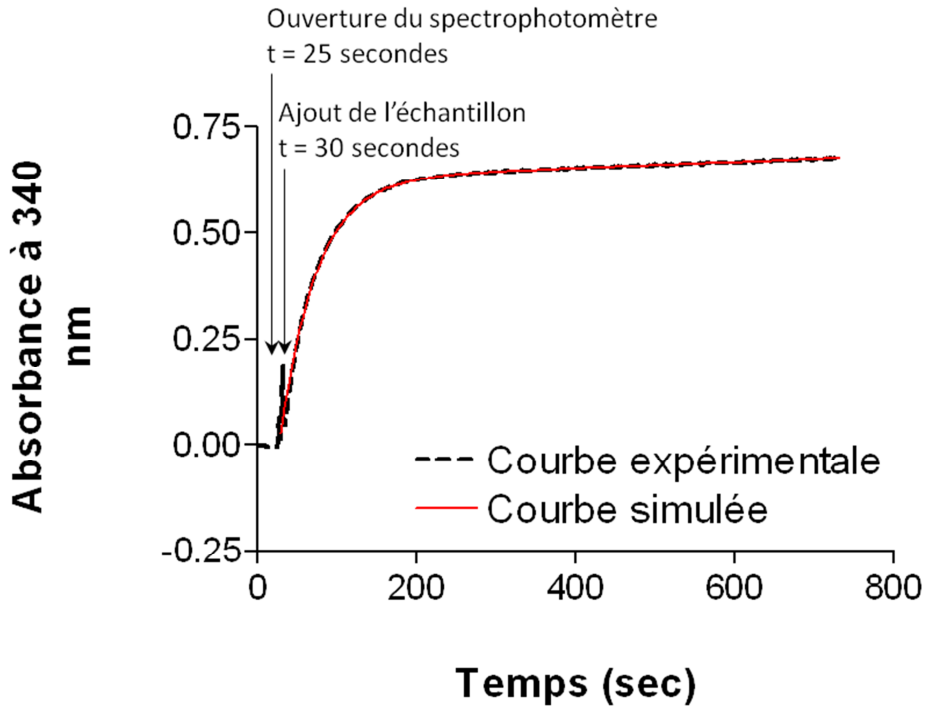


Figure II. 4. Courbe expérimentale de l'analyse d'un échantillon grâce à l'ADH.

La différence « A – B(t-30) » correspond à l'absorbance de la quantité totale de NADH généré et permet de calculer la concentration d'alanine consommée grâce au coefficient d'extinction molaire du NADH de 4427 $M^{-1}.s^{-1}$, calculé à partir d'une solution de L-alanine standard.

G . Expériences de reconstitution des centres Fe/S

L'ensemble des protocoles présentés ci-dessous ont été réalisés dans une boîte à gants (BAG) sous atmosphère contrôlée (O_2 < 8 ppm). Pour cela tous les tampons, les solutions ou les protéines ont été préalablement dégazés ; c'est-à-dire que l'oxygène a été remplacé par de l'azote par un système de bullage.

Le complexe NFS1-ISD11 (50 µM) est incubé en présence d'un équivalent d'ISCU (WT ou M106I), avec ou sans FXN, en présence ou non de 30 équivalents de DTT, dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) à 25°C. Dans un premier temps, une solution de sulfate d'ammonium ferreux (Fe $(NH_4)_2$ $(SO^4)_2$) est ajoutée au milieu réactionnel de manière à obtenir 4 équivalents de fer par rapport à la concentration en complexe. Après 2 minutes d'incubation à 25°C, la réaction de reconstitution de centres Fe/S est initiée par ajout de 30 équivalents de L-cystéine. Le volume réactionnel est alors divisé en deux parties : l'une va permettre de suivre la reconstitution de centres Fe/S par UV-visible, la seconde va permettre de suivre le comportement des persulfures lors de cette reconstitution par alkylation avec le $MalP_{16}$.

G . 1 . Suivi par UV-visible

Le mélange réactionnel (100 µL) est placé dans une cuve en quartz dont l'étanchéité, vis-à-vis de l'oxygène, est assurée par un septum. La première acquisition des spectres UV-visible se fait environ 2 minutes et 30 secondes après le début de la réaction sur le spectromètre Cary 100 Scan (Varian). Des spectres sont enregistrés toutes les 1 ou 3 minutes entre 250 nm et 900 nm.

G . 2 . Suivi par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

La cinétique est réalisée par prélèvement de 2 µL du mélange réactionnel et la réaction est stoppée par 2 équivalents de $MalP_{16}$ par rapport à la quantité totale de thiols (comprenant les cystéines des protéines, la L-cystéine ajoutée et le DTT lorsqu'il est présent) en présence de 10 mM d'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), permettant de complexer le fer présent dans le milieu. Après 3 minutes à 30°C, le mélange est incubé avec 2 % de SDS pendant 20 minutes à 30°C et sous agitation (550 rpm). La moitié du volume réactionnel est incubée avec 1 µL de DTT à 100 mM pendant 20 minutes à 25°C. L'autre moitié du volume réactionnel reste dans des conditions non réductrices. Chaque aliquot de réaction est déposé sur SDS-PAGE 8 % (analyse de NFS1) et 14 % (analyse d'ISCU).

H . Spectrométrie de masse

H . 1 . Analyse des protéines entières par ESI-Q/TOF

Pour l'analyse par spectrométrie de masse en protéine entière, le mélange réactionnel est composé de 40µM de complexe NFS1-ISD11 en présence d'un équivalent d'ISCU et/ou de FXN, incubé dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) à 25°C. La réaction commence lors de l'ajout de 10 équivalents de L-cystéine. Après 3 minutes à 25°C et 550 rpm, la réaction est stoppée par le passage du mélange réactionnel sur une colonne MicroBio-spin6 (Biorad) afin d'éliminer l'excès de L-cystéine. Après cet échange de tampon, les protéines sont dans un tampon dépourvu de sels : 50 mM d'acétate d'ammonium (NH_4OAc). Les échantillons protéiques sont ensuite dénaturés pendant 5 minutes dans un mélange contenant 50 % d'acétonitrile et 1 % d'acide formique (expériences réalisées par David CORNU, de la plateforme IMAGIF). L'analyse des échantillons est réalisée avec un spectromètre de masse ESI-Q/TOF (Q/TOF Premier, Waters, **Annexe 13**) équipé d'un dispositif « Nanomate » (Advion). Les spectres obtenus sont enregistrés avec une précision de masse estimée à ± 2 Da. L'énergie de collision a été fixée à 6 eV. Le logiciel « Mass Lynx 4.1 » est utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. La déconvolution des ions multi-chargés est effectuée avec le logarithme « MaxEnt1 ». Enfin, une calibration externe est

réalisée avec des centres « NaI » (2 µg/µL, 50 % isopropanol, Waters) dans la gamme *m/z* utilisée lors de l'acquisition.

H . 2 . Analyse des peptides par LTQ-Orbitrap XL

Pour l'analyse des peptides par le LTQ-Ortitrap XL, les échantillons sont préparés dans le tampon C avec 20 µM de complexe NFS1-ISD11-ISCU avec ou sans FXN. La réaction est initiée avec 20 équivalents de L-cystéine. Le complexe NIU est incubé 1 heure à 37°C et sous agitation à 550 rpm et le complexe NIUF est incubé 1 minute à 25°C et 550 rpm, afin de permettre la formation de persulfures sur ces deux complexes. La réaction est stoppée avec 4 mM d'iodoacétamide (IAA). Après 15 minutes d'incubation dans le noir, 130µL de tampon C contenant 8 M d'urée et 50 mM IAA sont ajoutés au mélange, qui incube à nouveau 1 heure à 30°C dans le noir. L'excès d'iodoacétamide est éliminé par précipitation au TCA ; où une concentration finale de 10 % de TCA est ajoutée au mélange, entrainant la précipitation des protéines ; suivi d'une centrifugation de 15 000 rpm à 4°C. Le culot protéique est lavé trois fois avec 500 µL d'acétone par des cycles lavage/centrifugation à 15 000 rpm et 4°C. Le culot est remis en solution dans du tampon C avec 8 M d'urée. Les échantillons sont ensuite dilués d'un facteur 6 à 8 avant d'ajouter la trypsine au mélange (2 % de trypsine par mg de protéine à cliver). Le mélange incube 2 heures à 37°C.

Les analyses sont réalisées par Jean-Pierre LE CAER (ICSN). Les peptides sont injectés sur une chaîne chromatographique constituée d'un injecteur automatique réfrigéré, d'une pompe conventionnelle permettant le chargement et d'une micro-colonne (5mm x 300µm) permettant le nettoyage de l'échantillon à un débit de 20 µL/min dans une solution de 0,1 % TFA. Les peptides sont ensuite injectés sur une nano-colonne C18 (75 µm x 50 cm, PepMap100 C18, 3 µm, 100 Å, Dionex), équilibrée avec une solution de 0,1 % d'acide formique, et élués en 1 heure, avec un gradient linéaire d'acétonitrile allant de 2 % à 60 %, avec un débit de 250 nL/min. La nano-chaine HPLC est couplée à un LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, **Annexe 14**). La masse et les spectres de fragmentation sont utilisés pour identifier les protéines dans les banques de séquences ainsi que leurs modifications éventuelles. La recherche dans les banques est effectuée à l'aide de Mascot, interfacé par le logiciel du constructeur Proteome Discoverer, PD1-3. A posteriori les

intensités en fonction du temps des ions ayant permis une identification sont intégrées dans le chromatogramme.

I . Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

I . 1 . AccQ-Fluo Reagent Kit

L'AccQ-Fluo reagent kit (Waters) a été utilisé afin de caractériser les acides aminés présents dans les mélanges réactionnels par HPLC. Généralement, les composés séparés par HPLC sont détectés avec un détecteur UV ; or, les acides aminés seuls en solution sont peu ou pas sensibles à l'ultra violet. C'est pourquoi ces acides aminés ont été dérivatisés avec un composé nommé AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) (**Figure II. 5**).

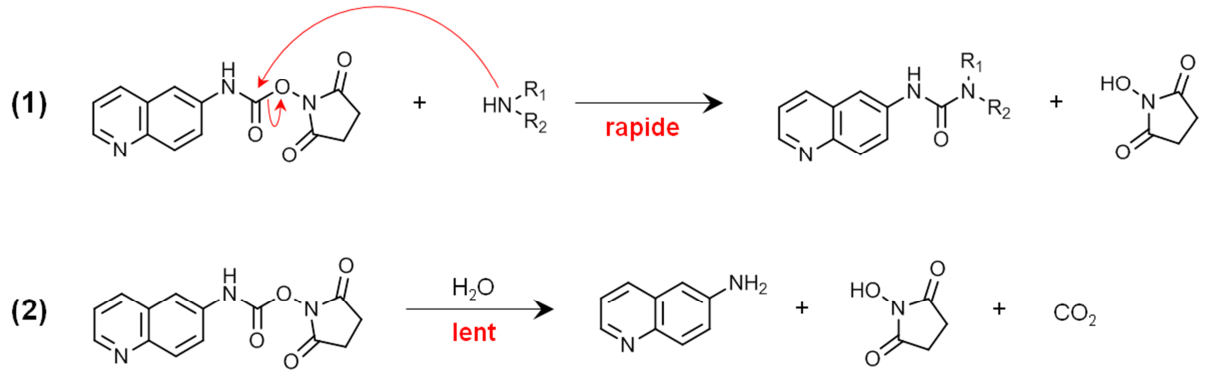


Figure II. 5. Principe de la dérivatisation des amines primaires et secondaires par l'AQC. La réaction (1) représente le mécanisme d'action des amines primaires et secondaires sur l'AQC. La réaction (2) correspond à la réaction parasite de l'AQC avec l'eau.

L'AQC réagit très rapidement avec les amines primaires et les amines secondaires, pour former des composés stables et détectables par fluorescence ($\lambda_{excitation}$: 250 nm et $\lambda_{émission}$: 395 nm). Il existe une réaction parasite, beaucoup plus lente, entre l'AQC et l'eau, qui ne gêne en rien la dérivatisation des acides aminés, car l'AQC est ajouté en très large excès.

I . 2 . Protocole

Le mélange réactionnel contient 2 µM de complexe NFS1-ISD11 dans du tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8) à 25°C, pour un volume final de 300 µL. La réaction est initiée avec 1,5 mM de L-cystéine. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les petites molécules sont séparées des protéines en utilisant une colonne d'Amicon Ultra ayant un « cut off » de 10 kDa. Ensuite, 20 µL d'éluat sont incubés avec 20 µL d'une solution d'AQC à 10 mM dans l'acétonitrile et 60 µL de tampon borate fournis par le kit « AccQ-Fluo reagent ». Après quelques secondes de vortex, le mélange est incubé 10 minutes à 55°C.

Les analyses d'échantillons ont été réalisées sur un appareil HPLC Alliance 2695 avec le détecteur de fluorescence W2475, sur une colonne AccQ-Tag (3,9 mm x 150 mm, taille des particules : 4 µm, C18, Waters), à un débit de 1 mL/min à 35 °C. Enfin, pour chaque analyse, les différents composants ont été séparés par un gradient effectué par le mélange entre 140 mM NH_4OAc à pH 5 (acétate d'ammonium, tampon 1), de l'acétonitrile (tampon 2) et de l'eau ultra pure (tampon 3) comme décrit dans le **Tableau II. 3** suivant :

Temps (minutes)	% Tp 1	% Tp 2	% Tp 3	curve
0	100	0	0	1
0,5	99	1	0	11
18	95	5	0	6
19	91	9	0	6
29,5	83	17	0	6
33	0	60	40	11
36	100	0	0	11

Tableau II. 3. Récapitulatif du gradient suivi au cours des analyses d'échantillons par HPLC. Le gradient se compose d'un mélange entre 140 mM d'acétate d'ammonium (Tp 1), d'acétonitrile (Tp 2) et d'eau ultra pure (Tp 3).

J . Dosage du soufre dans la protéine NSP5

Nous avons eu l'occasion de collaborer avec l'équipe de Didier Poncet, du laboratoire de virologie moléculaire et structurale, sur une protéine virale nommée NSP5 (nonstructural protein 5). L'équipe a démontré que la protéine NSP5 possède un centre [2Fe-2S] nécessaire à sa fonction (Martin *et al.* 2013) (Cf. Article 1). Nous avons réalisé le dosage du soufre

contenu dans ce centre Fe/S selon le principe décrit dans la partie F. 2. 1. et selon le protocole suivant. La protéine NSP5 à 20 µM, 30 µM ou 50µM, est incubée dans un tampon MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 20 mM, pH 7,1) pour un volume final de 115 µL. La protéine est tout d'abord dénaturée en milieux basique, pour conserver les ions sulfures du centre Fe/S sous la forme S^{2-}, avec 10 µL de NaOH à 30 % ajouté au mélange réactionnel. Après 15 minutes, 125 µL de DMPD à 0,1% dans 5 N HCl et 50 µL de $FeCl_3$ à 11,5 mM dans 1,2 N HCl sont additionnés ; et une coloration bleue apparait. Après 2 heures d'incubation à 25°C, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 13 400 rpm. Enfin, 500 µL d'eau ultra pure sont ajoutés pour obtenir un volume final de 800 µL, permettant la mesure de l'absorbance à 670 nm, avec un coefficient d'extinction molaire de 34 500 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$ (Tsai *et al.* 2010).

Chapitre III

Purification des protéines et étude de la formation des complexes de la machinerie ISC

Chapitre III. Purification des protéines et étude de la formation des complexes de la machinerie ISC

Afin d'étudier les étapes primaires de la biogenèse des centres Fe/S, nous avons produit et purifié les protéines recombinantes de souris NFS1, ISD11, ISCU et FXN qui composent la machinerie ISC. Nous verrons dans une première partie que la protéine NFS1 a été obtenue de manière soluble uniquement sous la forme d'un complexe avec la protéine ISD11 ; et que les deux autres protéines, ISCU et FXN, ont été obtenues individuellement sous une forme soluble. Dans une seconde partie, nous présenterons l'étude de la formation des complexes entre ces quatre protéines.

A . Purification des protéines

A . 1 . Obtention des plasmides et surexpression des protéines

Les protéines NFS1, ISCU et FXN sont adressées à la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage spécifique située en N-terminal. Une fois la protéine importée, cette séquence est clivée, conduisant à la forme dite « mature » de la protéine. La protéine ISD11 ne possède pas de séquence d'adressage clivable ; elle est potentiellement importée dans la mitochondrie via une séquence d'adressage interne. Il a été prédit par Nakai *et al.*, que la séquence d'adressage à la mitochondrie de la protéine NFS1 de souris pourrait correspondre aux acides aminés 1 à 41 (**Figure III. 1**) (Nakai *et al.* 1998).

Avant mon arrivée au laboratoire, Frédéric Canal a produit la protéine NFS1 de souris avec la séquence codante 42-459. Malheureusement, après l'extraction des protéines, la très grande majorité de la protéine NFS1 (42-459) formait des corps d'inclusion (Canal 2007), suggérant que la séquence d'adressage (1 – 41) n'était pas correcte. Cependant, l'équipe de D. Pain est parvenue à exprimer une forme soluble de la protéine Nfs1 de *S. cerevisiae* (Nfs1 Δ1-36), l'homologue de NFS1 (Naamati *et al.* 2009; Pandey *et al.* 2012) en s'inspirant des prédictions réalisées par Nakai *et al.*, qui suggère que la séquence d'adressage pour Nfs1 levure correspond aux acides aminés 1 à 33 (**Figure III. 1**) (Nakai *et al.* 1998).

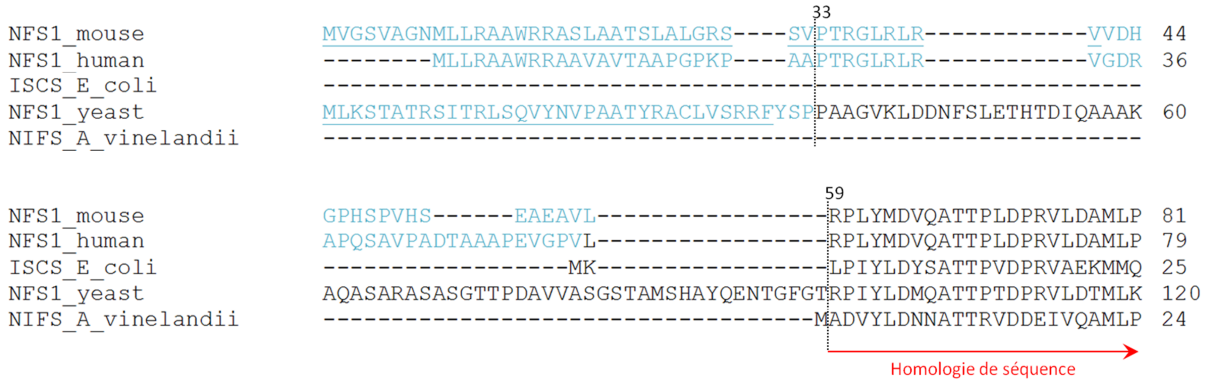


Figure III. 1. Alignement des séquences en N-terminal des cystéines désulfurases procaryotes et eucaryotes. Alignement des extrémités N-terminale des protéines NFS1 humaine et de souris, Nfs1 de *S. cerevisiae*, IscS d'*E. coli* et NifS d'*A. vinelandii*. Les séquences d'adressage à la mitochondrie de NFS1 souris et Nfs1 *S. cerevisiae* prédites par (Nakai *et al.* 1998) sont soulignées et les extrémités N-terminale des protéines Nfs1 *S. cerevisiae* (Pandey *et al.* 2012), NFS1 humaine (Tsai *et al.* 2010) et NFS1 (59-459) de souris utilisées sont en bleu. La forme NFS1 (33-459) correspondant à la forme soluble de Nfs1 Δ1-36 est repérée grâce à la numérotation.

Nous avons donc réalisé des alignements de séquences entre les extrémités N-terminale de NFS1 souris et Nfs1 levure (**Figure III. 1**). Bien qu'il existe très peu d'homologie de séquence, ces alignements suggèrent que la séquence d'adressage de NFS1 souris pourrait être plus courte et correspondre aux acides aminés 1 à 32 (**Figure III. 1**). Nous avons donc construit une forme Δ1-32 de NFS1 souris que nous avons clôné dans un vecteur pET-28, précédé d'une étiquette poly-histidine et d'un site de clivage de la thrombine (pET-28b-$NFS1_{33\text{-}459}$). En 2006, il a été montré, par deux équipes différentes, que la protéine eucaryote de levure Isd11 permet une meilleure stabilité de la protéine Nfs1 (Adam *et al.* 2006; Wiedemann *et al.* 2006). Ainsi, la co-expression de la protéine NFS1 avec la protéine ISD11 permet d'obtenir une forme soluble de NFS1 en complexe avec ISD11 (Schmucker *et al.* 2011). Nous avons donc également construit un vecteur permettant la co-expression de ces deux protéines en utilisant les séquences codantes des formes matures des protéines de souris NFS1 (59-459) et ISD11, fournis par le Dr. H. Puccio (IGBMC, Strasbourg) ; qui ont été clonées et insérées dans un vecteur de co-expression pCDFDuet-1, avec une étiquette poly-histidine et un site clivage thrombine dans la partie N-terminale de NFS1.

Les séquences codantes des protéines matures d'ISCU (36-168) et de FXN (79-207) murines ont été clonées et insérées, respectivement dans les vecteurs pETDuet-1 et pET-16b, avec chacune une étiquette poly-histidine et un site de clivage thrombine en N-terminal. A partir de ces plasmides, nous avons réalisés des mutants ponctuels des protéines ISCU (C35S, C61S, C104S, C104G et M107I) et FXN (R162A).

Les plasmides ont été transformés dans des bactéries compétentes Rosetta 2 (DE3), qui expriment les ARN de transfert correspondant à des codons sous représentés dans le génome d'*E. coli* et permettant une expression optimale des protéines eucaryotes qui possèdent ces codons rares. Les cellules ont ensuite été lysées avec une presse de French, méthode douce pour limiter la dénaturation des protéines.

A . 2 . Purification des protéines

Les protéines ont été purifiées en quatre étapes. Elles ont tout d'abord été séparées par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel. Après un échange de tampon avec une colonne de désalage pour retirer l'imidazole, l'étiquette poly-histidine des protéines a été clivée par la thrombine. Un second passage sur la colonne de nickel est réalisée afin d'éliminer les étiquettes poly-histidine clivées et la thrombine, qui possède aussi une étiquette poly-histidine. Enfin, les protéines sont séparées des contaminants restant par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 75 ou 200.

A . 2 . 1 . Purification de NFS1 et du complexe NFS1-ISD11

A . 2 . 1 . 1 . Analyse des extraits bruts

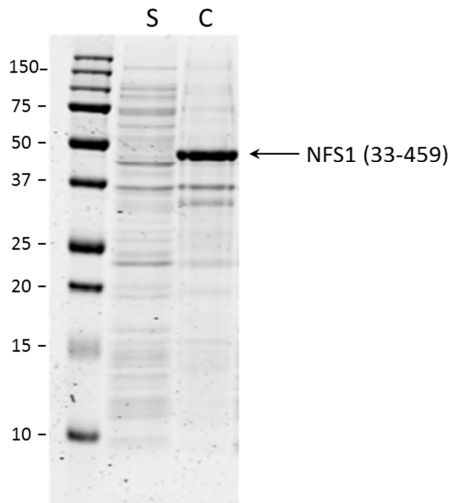


Figure III. 2. Extraction de la protéine NFS1 (33-459). SDS-PAGE 14 % des extraits solubles et insolubles correspondant au surnageant (S) et au culot (C) obtenus après l'extraction des protéines. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

Nous avons tenté d'exprimer la forme Δ1-32 de NFS1 construite par homologie avec la forme Δ1-36 de Nfs1 levure. Cependant, nous avons constaté que la quasi-totalité de la protéine est présente dans les corps d'inclusions (**Figure III. 2**).

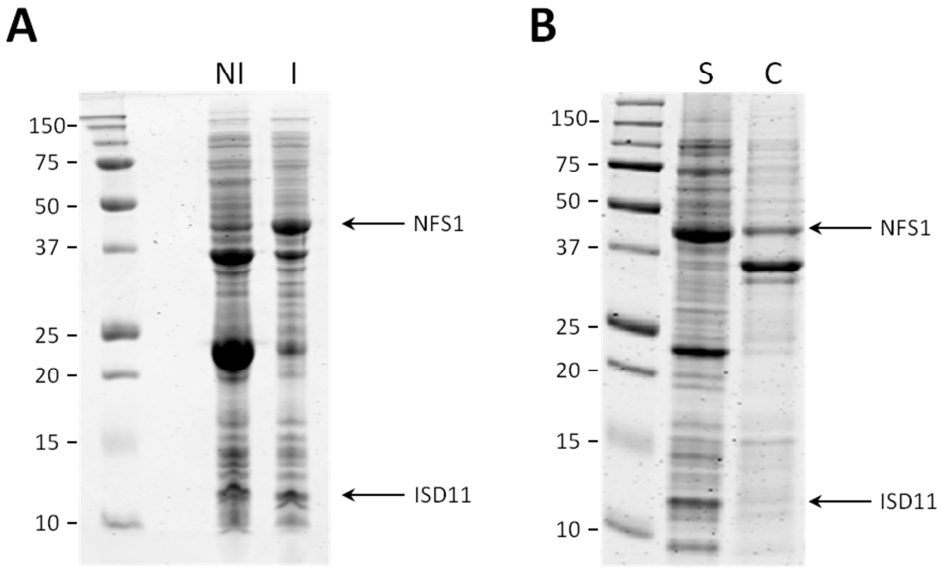


Figure III. 3. Surexpression et Extraction des protéines NFS1 et ISD11. A. Gel SDS-PAGE 14 % des extraits totaux avant (NI) et une nuit après l'induction à l'IPTG (I). **B.** SDS-PAGE 14 % des fractions solubles et insolubles correspondant au surnageant (S) et au culot (C) obtenus après l'extraction des protéines. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

Nous nous sommes donc orientés vers le système de co-expression des protéines NFS1 (59-459) et ISD11. L'analyse des extraits cellulaires, induits ou non par l'IPTG, montre la présence d'une protéine majoritaire, ayant un poids moléculaire situé entre 37 kDa et 50 kDa (**Figure III. 3**, **A**). Cette protéine est compatible avec la forme 6His-Thr-NFS1$_{59\text{-}459}$, d'une masse moléculaire d'environ 46 kDa. Il semble que l'expression d'une protéine d'environ 11 - 12 kDa soit également induite, pouvant correspondre à la protéine ISD11, de poids moléculaire d'environ 11 kDa (**Figure III. 3, A**). L'analyse des fractions solubles et insolubles montre que la majorité de NFS1 et de ce qui semble correspondre à ISD11 sont exprimées sous forme soluble. Environ 20 % de NFS1 est présent dans la fraction insoluble tandis que la protéine ISD11 est totalement absente de cette fraction. Ces résultats suggèrent que la co-expression d'ISD11 avec NFS1 permet d'obtenir une forme soluble de NFS1 (59-549). La solubilité de NFS1 (80%) est potentiellement limitée par la quantité d'ISD11 exprimée. Il faut noter qu'un niveau d'expression aussi faible est étonnant pour une protéine de la taille d'ISD11.

A . 2 . 1 . 2 . Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité a été réalisée sur une colonne de nickel. Les fractions solubles des extraits bruts ont été injectées en présence de 5 mM d'imidazole pour limiter la fixation des contaminants et les protéines retenues ont été éluées par un gradient linéaire d'imidazole (**Figure III. 4**, **A**).

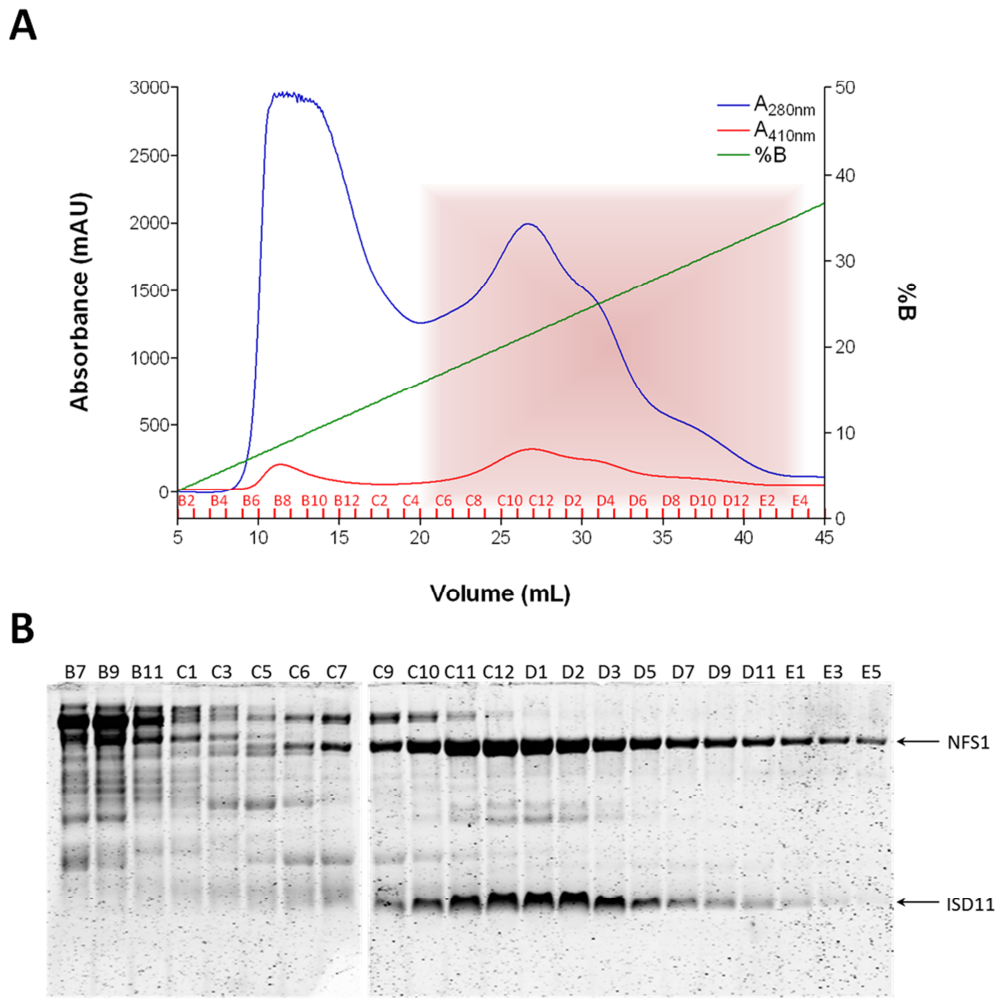


Figure III. 4. Purification du complexe NFS1-ISD11 par chromatographie d'affinité. A. Chromatogramme acquit pendant la phase d'élution. Le « % B » correspond au gradient d'imidazole linéaire obtenu par le mélange du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8) et du tampon B (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8). L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant les protéines NFS1 et ISD11. **B.** SDS-PAGE 14 % des différentes fractions récoltées.

Les chromatogrammes montrent un pic très large pour 10 % de tampon B et plusieurs pics entre 20 et 30 % de tampon B. Le rapport entre les absorbances à 410 nm et à 280 nm est plus important dans le second pic et ses épaulements. De plus, les fractions du second pic sont jaunes, ce qui indique clairement la présence du PLP et suggère que la protéine NFS1 est

éluée dans le second pic. La présence de la protéine NFS1 est confirmée par SDS-PAGE (**Figure III. 4**, **B**). L'analyse des gels montre que les protéines NFS1 et ISD11 co-éluent, ce qui confirme la formation d'un complexe entre NFS1 et ISD11, car seule NFS1 possède une étiquette poly-histidine. Plusieurs contaminants sont encore présents avec le complexe NFS1-ISD11, nécessitant une seconde étape de purification.

A . 2 . 1 . 3 . Test de clivage par la thrombine

Nous avons ensuite réalisé des tests de clivage de l'étiquette poly-histidine de NFS1 en utilisant des concentrations croissantes en thrombine.

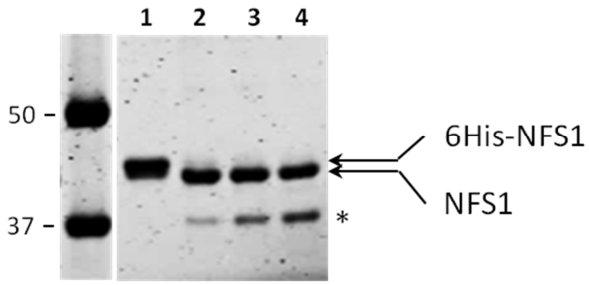


Figure III. 5. Test de clivage de l'étiquette poly-histidine de NFS1. SDS-PAGE 8 % montrant les résultats du test de clivage de l'étiquette poly-histidine de NFS1 (10 µg) en absence (1) ou en présence de quantité croissante de thrombine : (2) 0,05 ; (3) 0,10 et (4) 0,20 unités NIH et après 18 heures d'incubation. Le symbole * indique le forme tronquée de la protéine NFS1. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Les résultats montrent que NFS1 est complètement clivée avec 0,05 unités de thrombine ; cependant, une forme tronquée de la protéine d'un poids moléculaire d'environ 37 kDa est également générée (**Figure III. 5**). Cette forme tronquée de NFS1 correspond probablement à un clivage aspécifique de la protéine par la thrombine. Malheureusement, en essayant de faire varier à la fois la quantité de thrombine et le temps d'incubation, la protéine NFS1 se retrouve simultanément sous trois formes différentes, non-clivée, clivée et tronquée. La protéine NFS1 étant un dimère, ces trois formes de la protéine ne peuvent pas être séparées au cours de chromatographie d'exclusion de taille. Afin d'obtenir une forme homogène de NFS1, nous avons décidé de ne pas cliver l'étiquette poly-histidine de NFS1.

A . 2 . 1 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique

Le complexe NFS1-ISD11 a ensuite été purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 200 afin d'éliminer les protéines contaminantes.

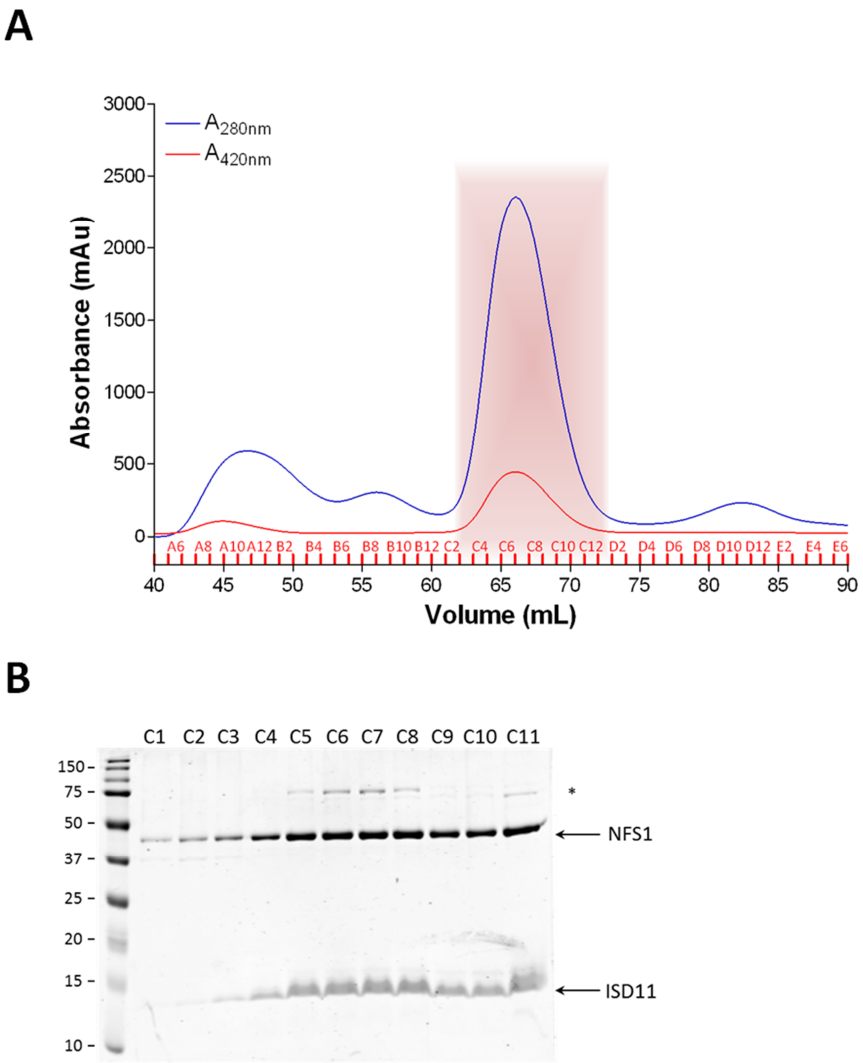


Figure III. 6. Purification du complexe NFS1-ISD11 par chromatographie d'exclusion de taille. A. Chromatogramme acquit pendant l'élution des protéines sur la colonne Superdex 200. L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant les protéines NFS1 et ISD11. **B.** SDS-PAGE 14 % des différentes fractions récoltées. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

Le chromatogramme montre quatre pics avec des volumes d'élution de 47 mL, 53 mL, 66 mL et 82 mL (**Figure III. 6**, **A**). Seul le troisième pic montre une absorbance significative à 410 nm. L'analyse par électrophorèse nous confirme la présence de la protéine NFS1 uniquement dans ce pic, qui co-élue de nouveau avec la protéine ISD11, ce qui confirme clairement que NFS1 et ISD11 forment un complexe (**Figure III. 6**, **B**). D'après la courbe d'étalonnage de la colonne Superdex 200, le volume d'élution du complexe NFS1-ISD11

correspond à poids moléculaire d'environ 100 kDa, ce qui est compatible avec un dimère de NFS1 et une ou plusieurs protéines ISD11. L'assemblage sous forme dimère avait été caractérisé préalablement par d'autres équipes (Cupp-Vickery *et al.* 2003; Prischi *et al.* 2010; Shi *et al.* 2010; Marinoni *et al.* 2012; Colin *et al.* 2013).

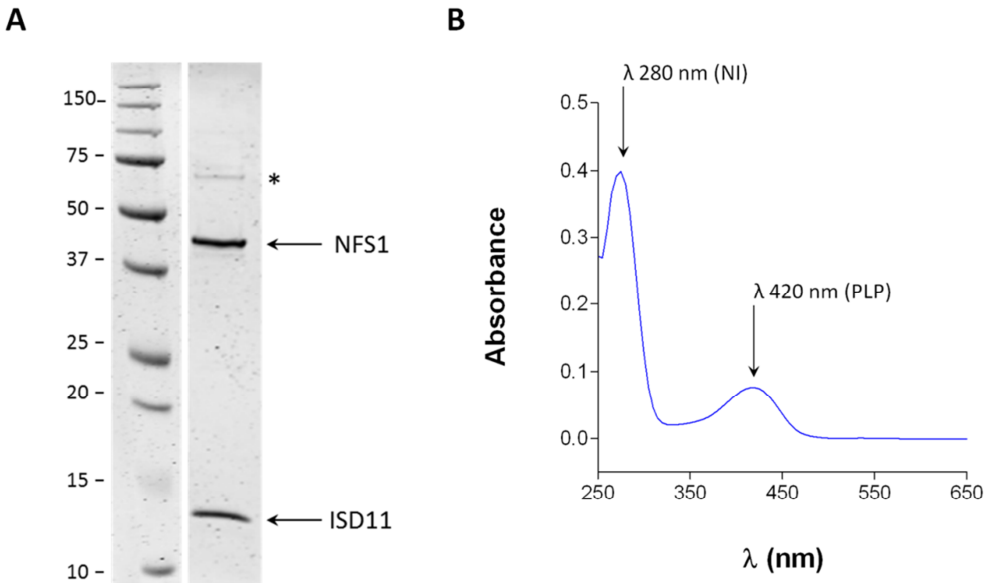


Figure III. 7. Etat de pureté du complexe NFS1-ISD11. A. Gel SDS-PAGE 14 % montrant le complexe NFS1-ISD11 purifié. Le symbole * indique une impureté toujours présente dans la solution finale du complexe. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa. **B.** Spectre UV-visible du complexe NFS1-ISD11 purifié.

Les rendements de protéines obtenus à l'issue de la purification sont de l'ordre de 3 mg de complexe par litre de culture, avec un complexe pure à 90 - 95 %, en raison d'un certain nombre de contaminants qui n'ont pas pu être supprimés (**Figure III. 7**, **A**). Nous avons également cherché à déterminer la stœchiométrie du complexe NFS1-ISD11 en mesurant les intensités des bandes sur les gels. Nos résultats suggèrent un rapport (NFS1:ISD11) de (1:3). Etonnamment, la détermination de la masse exacte du complexe NFS-ISD11-ISCU-FXN avait conduit à un rapport (1:2) (Colin *et al.* 2013). En utilisant cette stœchiométrie pour déterminer le coefficient d'extinction molaire du complexe NFS1-ISD11, nous avons trouvé un meilleur accord avec la détermination par la technique Bradford (Cf. Chapitre II), suggérant effectivement une stœchiométrie (1:3) pour le complexe NFS1-ISD11. A l'aide des coefficients d'extinction molaire de 10 900 M^{-1}. cm^{-1} à 420 nm pour le PLP et de 61 200 M^{-1}. cm^{-1} à 280 nm pour la chaîne polypeptidique du complexe NFS1-ISD11 et avec une stœchiométrie (1:3) ; nous avons estimé que plus de 95 % des complexes possèdent leur cofacteur PLP (**Figure III. 7**, **B**).

Pour finir, nous avons caractérisé le complexe NFS1-ISD11 par spectrométrie de masse en protéine entière (**Figure III. 8**). Le spectre obtenu présente trois pics majoritaires avec des masses de 10 723,0 ± 2 uma (unité de masse atomique, 1 uma ≈ 1 Da), 46 322 ± 2 uma et de 46 500 ± 2 uma. Les deux premiers pics correspondent aux masses attendues pour les protéines ISD11 (10 723,3 Da) et 6His-Thr-NFS1$_{59-459}$ (46 322 Da), et le troisième pic possède un gain de masse de 178 Da par rapport à NFS1.

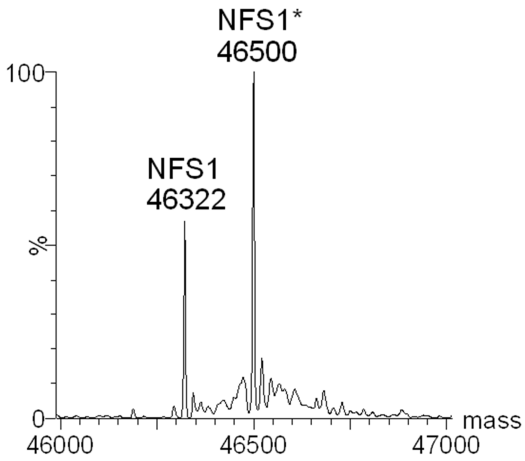


Figure III. 8. Spectre de masse ESI-Q/TOF du complexe NI. Spectre de masse reconstitué du complexe NI (40 µM) en absence de L-cystéine. Le spectre présenté correspond à un zoom réalisé sur la zone 46 à 47 kDa.

En recherchant sur le site « the Association of Biomolecular Resource Facilities » (ABRF) les modifications pouvant correspondre à cette différence de masse, nous avons trouvé la α-N-gluconoylation, qui est une modification que l'on peut retrouver dans les protéines ayant une étiquette poly-histidine (Geoghegan *et al.* 1999). Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la carte peptidique de NFS1 après une digestion tryptique.

A . 2 . 1 . 5 . Identification de la modification de NFS1 par LTQ-Orbitrap XL

A . 2 . 1 . 5 . 1 . Principe du LTQ-Orbitrap XL

Le mélange de peptides a été analysé à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (Cf. **Annexe 13**). Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap est constitué d'une trappe linéaire et d'un analyseur à haute résolution, l'Orbitrap. L'appareil est également

couplé à une nano chaîne HPLC qui permet la séparation des peptides en fonction de leurs caractères hydrophobes. Les deux analyseurs, la trappe linéaire et l'Orbitrap, fonctionnent simultanément. Les peptides élués sont analysés par l'Orbitrap, pour déterminer leurs masses avec une précision inférieure à 5 ppm. Pendant ce temps, les six peptides les plus intenses sont fragmentés (MS/MS) par la trappe linéaire, qui mesure également la masse des fragments des peptides. Lors de l'analyse, nous avons utilisé le mode « data dependant analysis » du LTQ-Orbitrap, qui permet de contrôler l'acquisition des MS/MS de manière à obtenir un inventaire complet des peptides présents. Ce mode d'acquisition dit « intelligent » autorise qu'un ion donné soit sélectionné et fragmenté deux fois. Si cet ion élue en une vingtaine de secondes, il est alors exclu de la liste des peptides à fragmenter pendant une minute, c'est-à-dire le temps d'un pic chromatographique, afin d'éviter de fragmenter systématiquement les espèces les plus abondantes. Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap permet de collecter simultanément les masses précises des peptides, leurs fragments, leurs temps de rétention et leurs intensités.

A . 2 . 1 . 5 . 2 . Exploitation des résultats

L'analyse de la digestion tryptique du complexe NFS1-ISD11 sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL a permis de localiser la modification de 178 Da sur le peptide correspondant à l'étiquette poly-histidine : GHHHHHHSQLVPR.

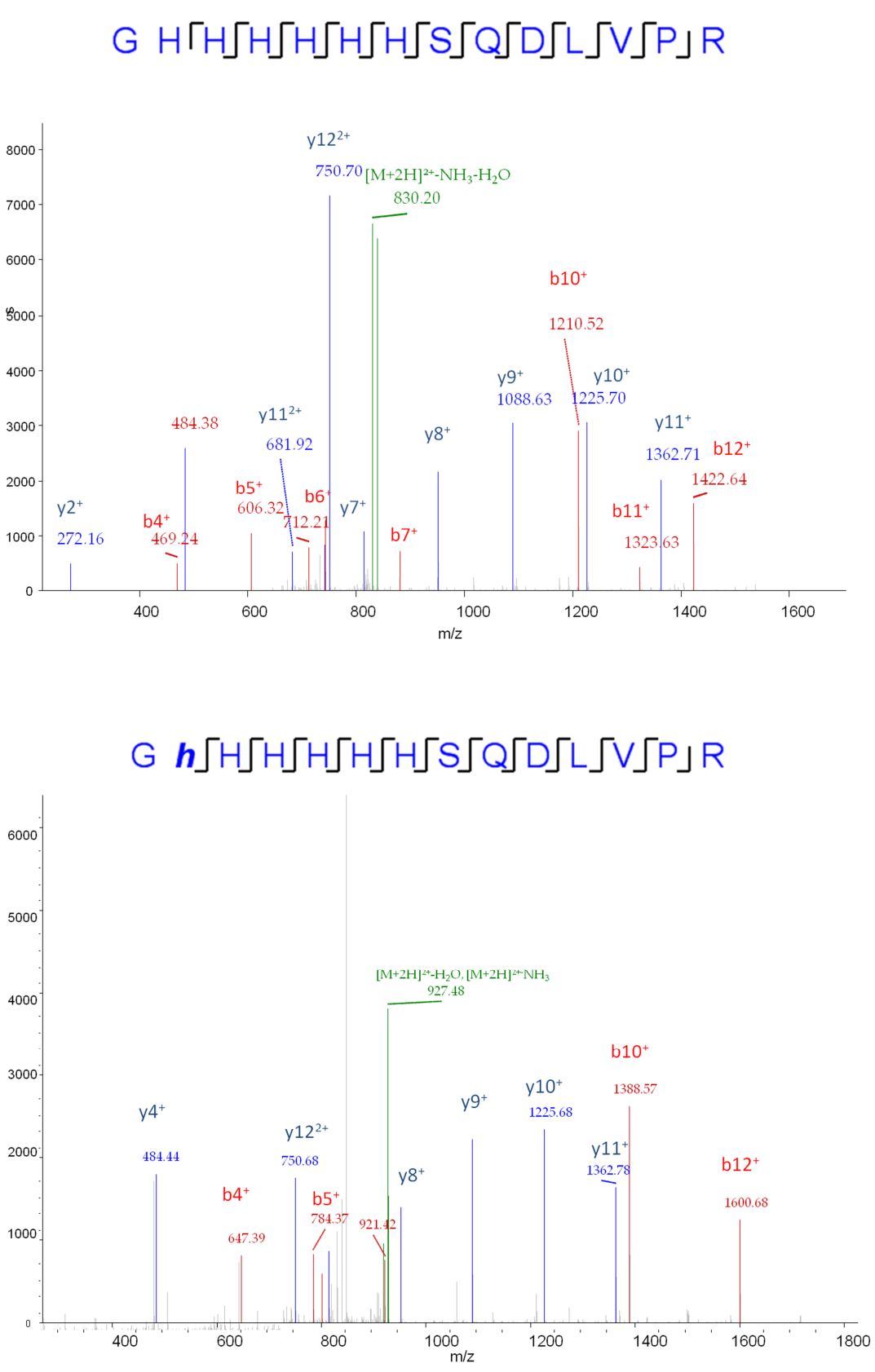


Figure III. 9. Analyse ORBITRAP-MS/MS du peptide GHHHHHHSQLVPR.

La **Figure III. 9** présente les résultats obtenus pour la fragmentation du peptide « GHHHHHHSQLVPR », contenant l'étiquette poly-histidine de la protéine. Les fragments générés sont résumés dans le **Tableau III. 1**. Les colonnes « H non modifiée » et « H-α-N-gluco » représentent le peptide sans modification ou portant une α-N-gluconoylation. La fragmentation d'un peptide passe généralement par la rupture de la liaison peptidique entre deux acides aminés. Elle peut s'effectuée du N- vers le C-terminal (b+) et inversement (y+). Lorsque nous comparons les masses des fragments « b+ » et « b^2+ » (N- vers-C-ter) entre « H non modifiée » et « H-α-N-gluco », nous constatons que dès la troisième histidine, les masses sont incrémentées de 178,05 Da, correspondant à une α-N-gluconoylation. Si nous comparons maintenant les masses des fragments « y+ » et « y^2+ » (C- vers N-ter), nous remarquons que les masses sont identiques jusqu'à la seconde histidine du peptide. L'ensemble de ces résultats confirme que le peptide « GHHHHHHSQLVPR » possède une α-N-gluconoylation sur le premier résidu histidine ou alors sur l'extrémité N-terminale de la glycine.

	H non modifiée		H-α-N-gluco			H non modifiée		H-α-N-gluco		
N°	b+	b^2+	b+	b^2+	**Séquence**	y+	y^2+	y+	y^2+	N°
1	58.029	29.518	58.029	29.518	**G**					14
2	195.088	98.047	373.135	187.071	**H**	1636.795	818.901	1814.843	907.92513	13
3	332.147	166.577	510.194	255.601	**H**	1499.736	750.372	1499.736	750.37180	12
4	469.206	235.106	647.253	324.130	**H**	1362.677	681.842	1362.677	681.84235	11
5	606.264	303.636	784.312	392.660	**H**	1225.619	613.313	1225.619	613.31289	10
6	743.323	372.165	921.371	461.189	**H**	1088.560	544.783	1088.560	544.78344	9
7	880.382	440.695	1058.430	529.718	**H**	951.501	476.254	951.501	476.25398	8
8	967.414	484.211	1145.462	573.234	**S**	814.442	407.724	814.442	407.72453	7
9	1095.473	548.240	1273.520	637.264	**Q**	727.410	364.208	727.410	364.20851	6
10	1210.500	605.754	1388.547	694.777	**D**	599.351	300.179	599.35117	300.17922	5
11	1323.584	662.296	1501.632	751.319	**L**	484.324	242.666	484.32422	242.66575	4
12	1422.652	711.830	1600.700	800.854	**V**	371.240	186.124	371.24015	186.12371	3
13	1519.705	760.356	1697.753	849.380	**P**	272.172	136.589	272.17173	136.58950	2
14					**R**	175.119	88.063	175.11896	88.06312	1

Tableau III. 1. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide GHHHHHHSQLVPR. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments du peptide GHHHHHHSQLVPR contenant ou non la modification α-N-gluconoylation "H non modifiée" et "H-α-N-gluco". Les annotations b+ (b2+) et y+ (y2+) représentes les masses mono-chargées (ou bi-chargées) obtenues pour la fragmentation successive de la liaison peptidique de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS présentée dans la **Figure III. 9**. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide modifié.

A . 2 . 2 . Purification de la protéine ISCU

A . 2 . 2 . 1 . Analyse des extraits bruts

Les extraits bruts des cellules dans lesquelles l'expression d'ISCU a été induite par l'IPTG, montrent la présence d'une protéine majoritaire vers 15 kDa (**Figure III. 10**, **A**). La taille de cette protéine concorde avec la forme 6His-Thr-ISCU$_{36\text{-}168}$, d'une masse moléculaire d'environ 15 kDa. L'analyse des fractions solubles et insolubles montrent que la totalité de la protéine ISCU est présente dans la fraction soluble (**Figure III. 10**, **B**).

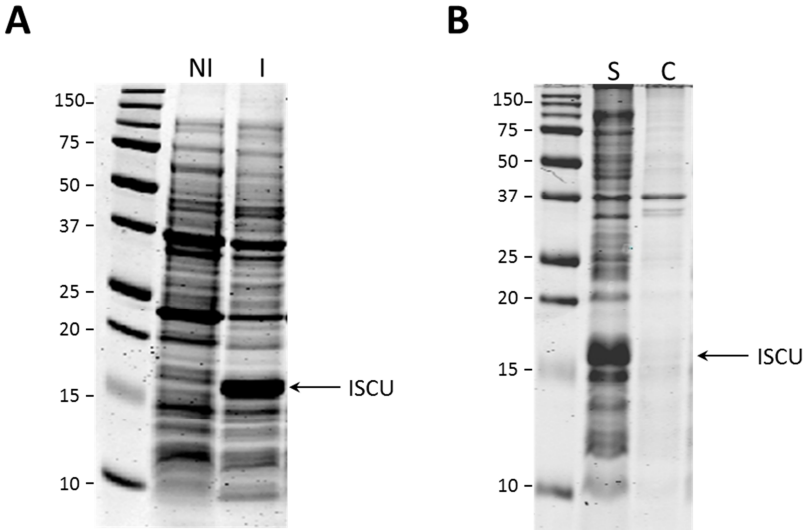


Figure III. 10. Surexpression et extraction de la protéine ISCU. A. Gel SDS-PAGE 14 % des extraits totaux avant (NI) et une nuit après l'induction à l'IPTG (I). **B.** SDS-PAGE 14 % des fractions solubles et insolubles correspondant au surnageant (S) et au culot (C) obtenus après l'extraction des protéines. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

A . 2 . 2 . 2 . Chromatographie d'affinité

Le chromatogramme d'élution nous présente deux pics majoritaires pour 10 % et 35 % de tampon B (**Figure III. 11**, **A**). Aucune absorbance significative à 410 nm n'est détectée et toutes les fractions récoltées sont incolores. L'analyse SDS-PAGE, révèle que la protéine ISCU est présente dans le second pic (**Figure III. 11**, **B**).

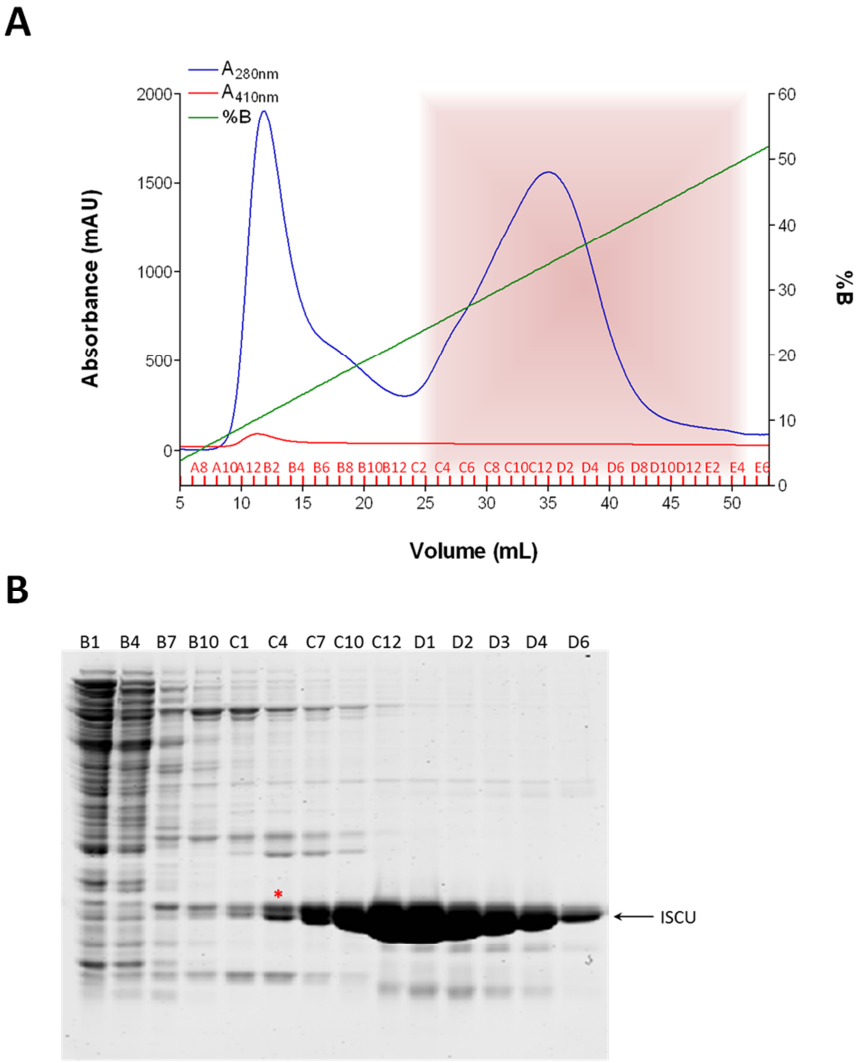


Figure III. 11. Purification de la protéine ISCU par chromatographie d'affinité. A. Chromatogramme acquit pendant la phase d'élution. Le « % B » correspond au gradient d'imidazole linéaire obtenu par le mélange du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8) et du tampon B (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8). L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant la protéine ISCU. **B.** SDS-PAGE 14 % des différentes fractions récoltées. Le symbole * marque la présence de deux bandes correspondant à la protéine ISCU.

A . 2 . 2 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU par la thrombine

Une analyse SDS-PAGE plus fine des fractions obtenues à l'issu de la première étape de purification, montre la présence d'une double bande vers 15 kDa dans laquelle la forme de plus faible poids moléculaire est majoritaire. (**Figure III. 11**, **B***).

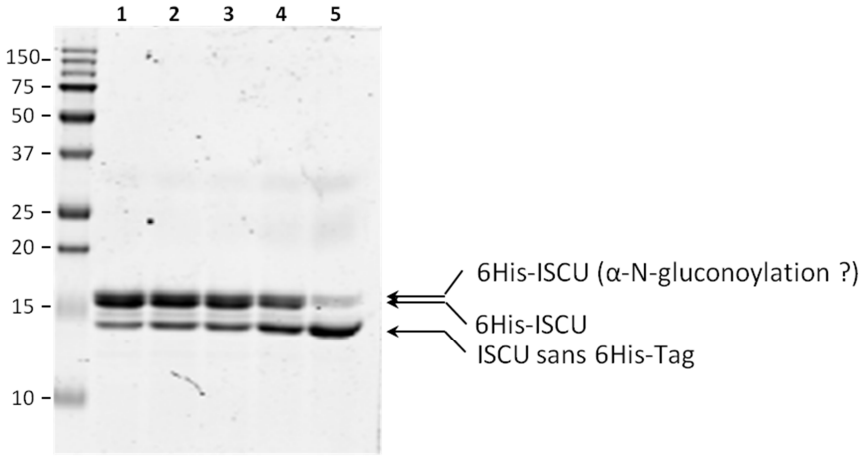


Figure III. 12. Test de Clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU. SDS-PAGE 14 % montrant les résultats du test de clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU (153 µg) en présence de quantité croissante de thrombine : (1) 0,05 ; (2) 0,10 ; (3) 0,15 ; (4) 0,30 et (5) 0,75 unités NIH et après 18 heures d'incubation. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

L'analyse par western blot nous a permis de confirmer que ces deux espèces correspondent à deux formes différentes de la protéine ISCU (non montré). Ces deux espèces pourraient correspondre à une forme entière de la protéine ISCU et à une forme protéolysée majoritaire. Etant donné que les deux protéines se sont fixées à la colonne de nickel, *via* leurs étiquettes poly-histidine en N-terminal, la forme tronquée d'ISCU serait sûrement clivée par son extrémité C-terminale. Cependant, après l'étape de clivage par la thrombine, l'analyse SDS-PAGE révèle la présence d'une bande unique, indiquant que les deux formes d'ISCU ont été converties en une forme unique (**Figure III. 12**). Ces résultats indiquent clairement que la forme protéolysée de la protéine n'est pas tronquée en C-terminal ; car sinon, nous l'aurions de nouveau observée après le clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine. L'hypothèse la plus probable est que la protéine ISCU était modifiée sur son extrémité N-terminale. Nous avons constaté par spectrométrie de masse que la protéine NFS1 était N-gluconoylée (+ 178 Da) (Cf. Partie A. 2. 1. 5.) et l'analyse d'autres protéines N-gluconoylées a montré que cette modification pouvait induire une différence de migration observable sur gel SDS-PAGE (Geoghegan *et al.* 1999). Nous avons donc formulé l'hypothèse que la protéine ISCU surexprimée dans la souche Rosetta 2 (DE3) d'*E. coli* est partiellement N-gluconoylée. Le clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine permet de s'affranchir de cette modification.

A . 2 . 2 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique

Après l'élimination du fragment correspondant à l'étiquette poly-histidine et de la thrombine par chromatographie d'affinité, l'échantillon a été injecté sur une colonne Superdex 75.

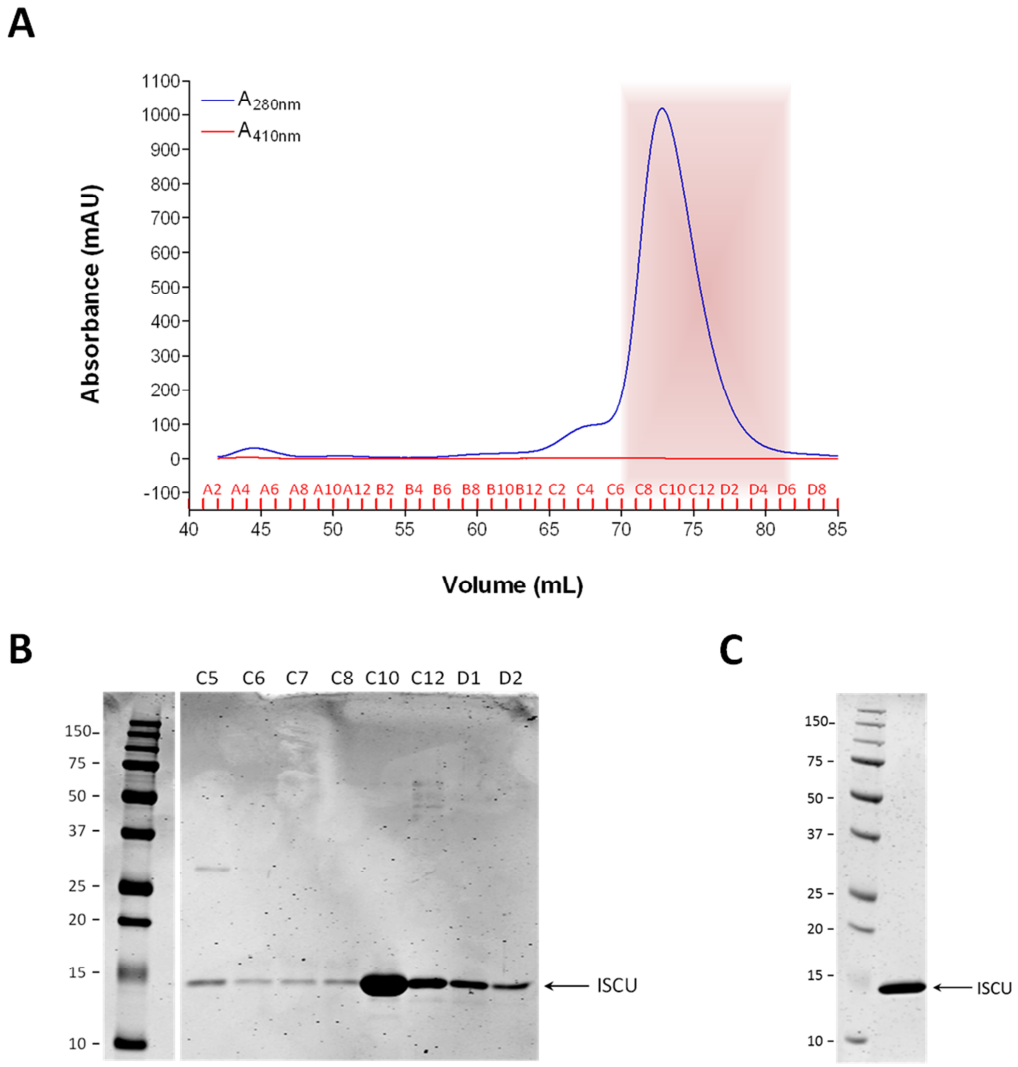


Figure III. 13. Purification de la protéine ISCU par chromatographie d'exclusion de taille. A. Chromatogramme acquit pendant l'élution des protéines sur la colonne Superdex 75. L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant la protéine ISCU. **B.** SDS-PAGE 14 % des différentes fractions récoltées. **C**. SDS-PAGE 14 % montrant la protéine ISCU purifiée. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Le chromatogramme montre un pic majoritaire, avec un volume d'élution de 73 mL et deux pics minoritaires vers 44 mL et 62 mL (**Figure III. 13**, **A**). L'analyse SDS-PAGE montre qu'ISCU est présente dans les deux pics à 62 mL et à 73 mL correspondant respectivement à des formes dimère et monomère (**Figure III. 13**, **B**). Nous avons uniquement travaillé avec la forme monomère de la protéine. L'analyse SDS-PAGE montre que la protéine ISCU est pure

à 99% avec un rendement de 9 mg de protéine pour un litre de culture (**Figure III. 13**, **C**). Enfin, une analyse par spectrométrie de masse montre un pic unique à 14 619 Da qui est cohérent avec la masse attendue de la protéine ISCU (36-168) à 14 617,8 Da (Cf. Chapitre IV).

Nous avons obtenu des résultats similaires pour l'expression des mutants C35S, C104S, C104G et M106I d'ISCU ; à l'exception du mutant C61S d'ISCU, qui dès l'étape de surexpression de la protéine dans les bactéries compétentes Rosetta 2 (DE3) présente un poids moléculaire apparent proche de 10 kDa après une migration SDS-PAGE (Cf. Partie B. 6.). Une analyse par spectrométrie de masse du mutant C61S d'ISCU montre un recouvrement de 87 % de la carte peptidique d'ISCU, dans laquelle les peptides N-terminaux et C-terminaux ont été identifiés. Cette analyse indique que la protéine correspond bien au mutant C61S d'ISCU et que celle-ci n'est probablement pas tronquée. De manière étonnante, l'analyse en protéine entière montre que la protéine a un poids moléculaire de 16 739 kDa, soit environ 2,137 kDa supplémentaires par rapport à la masse attendue de la protéine. Ainsi, l'ensemble de ces données indique que le mutant C61S d'ISCU a été produit et purifié avec une modification (indéterminé à ce jour) entrainant d'importants changements de migration de la protéine sur gel d'électrophorèse.

A . 2 . 3 . Purification de la protéine FXN

A . 2 . 3 . 1 . Analyse des extraits bruts

L'expression de la protéine FXN dans les cellules induites à l'IPTG montre une protéine majoritaire ayant un poids moléculaire proche de 15 kDa (**Figure III. 14**, **A**). Le poids moléculaire apparent de cette protéine est en accord avec la forme 6His-Thr-FXN_{79-207}, d'une masse moléculaire d'environ 15 kDa. L'analyse des fractions solubles et insolubles indique que la très grande majorité de la protéine FXN est présente dans la partie soluble (**Figure III. 14**, **B**).

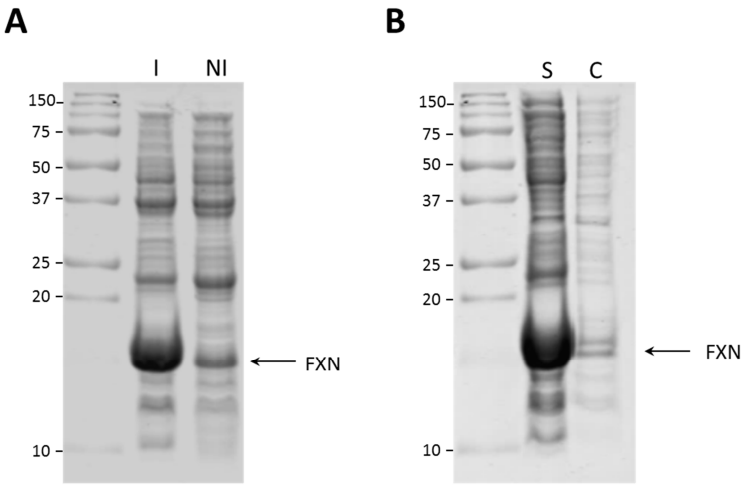


Figure III. 14. Surexpression et extraction de la protéine FXN. A. SDS-PAGE 14 % des extraits totaux avant (NI) et une nuit après l'induction à l'IPTG (I). **B.** Gel SDS-PAGE 14 % des fractions soluble et insoluble correspondant au surnageant (S) et au culot (C) obtenus après l'extraction des protéines. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

A . 2 . 3 . 2 . Chromatographie d'affinité

La fraction soluble a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité. Le chromatogramme d'élution montre un seul pic élué sur plusieurs dizaines de millilitre, avec une saturation de l'absorbance à 280 nm (**Figure III. 15**, **A**). L'analyse SDS-PAGE indique que ce pic correspond uniquement à la protéine FXN qui est quasiment pure après cette première étape de purification (**Figure III. 15**, **B**).

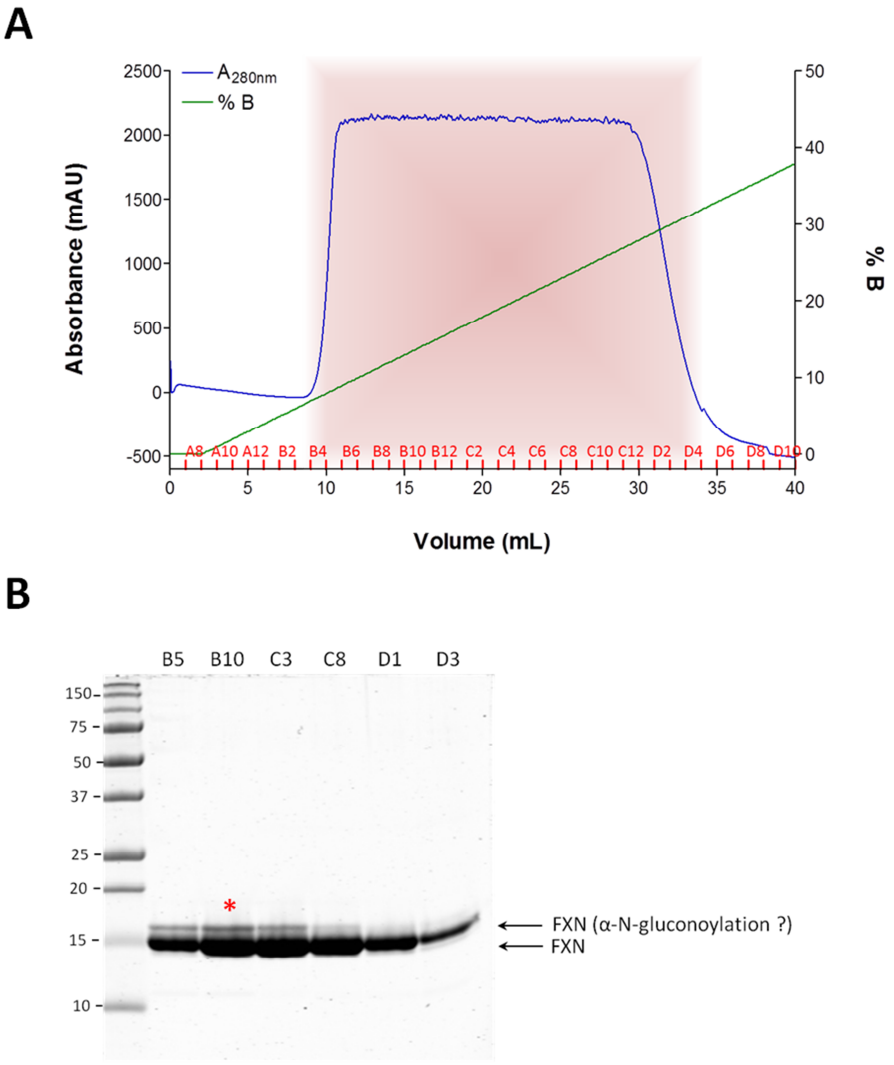


Figure III. 15. Purification de la protéine FXN par chromatographie d'affinité. A. Chromatogramme acquit pendant la phase d'élution. Le « % B » correspond au gradient d'imidazole linéaire obtenu par le mélange du tampon A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8) et du tampon B (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8). L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant la protéine FXN. **B.** SDS-PAGE 14 % des différentes fractions récoltées. Le symbole * marque la présence de deux bande correspondant à la protéine FXN. Le marqueur de poids moléculaires est en kDa.

A . 2 . 3 . 3 . Clivage de l'étiquette poly-histidine de FXN par la thrombine

L'étiquette poly-histidine a ensuite été clivée par la thrombine. Avant le clivage, le gel SDS-PAGE de la **Figure III. 15** montre deux espèces correspondant à la protéine FXN dont la forme minoritaire est la forme de plus haut poids moléculaire qui pourrait correspondre à une N-gluconoylation (**Figure III. 15**, **B***). De la même façon que pour la protéine ISCU, ces deux formes de la protéine FXN se combinent en une seule et unique forme après l'étape de clivage (**Figure III. 16**).

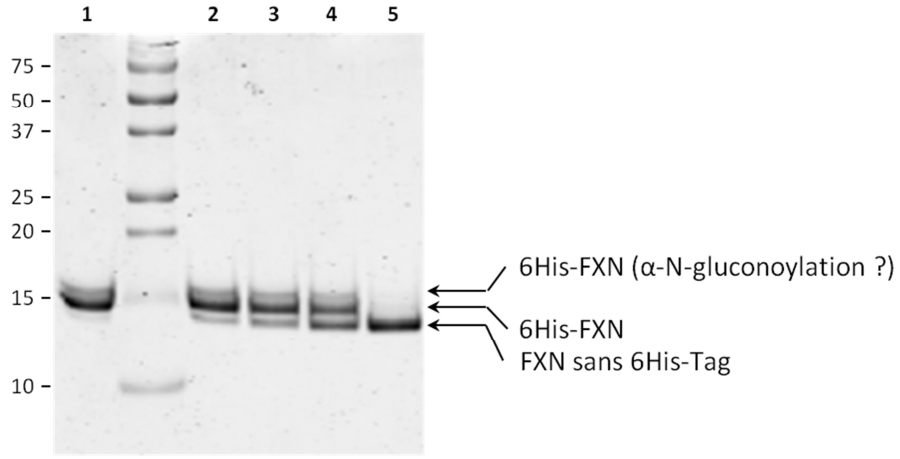


Figure III. 16. Test de clivage de l'étiquette poly-histidine de la protéine FXN. SDS-PAGE 14 % montrant les résultats du test de clivage de l'étiquette poly-histidine de FXN (5 µg) en absence (1) ou en présence de quantité croissante de thrombine : (2) 0,05 ; (3) 0,10 ; (4) 0,20 et (5) 0,50 unités NIH et après 3 heures d'incubation. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

A . 2 . 3 . 4 . Chromatographie d'exclusion stérique

Pour finir, la protéine est purifiée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 75. Le chromatogramme obtenu présente un seul pic correspondant à une forme monomère de FXN (Cf. Partie B. 4.) (**Figure III. 17**).

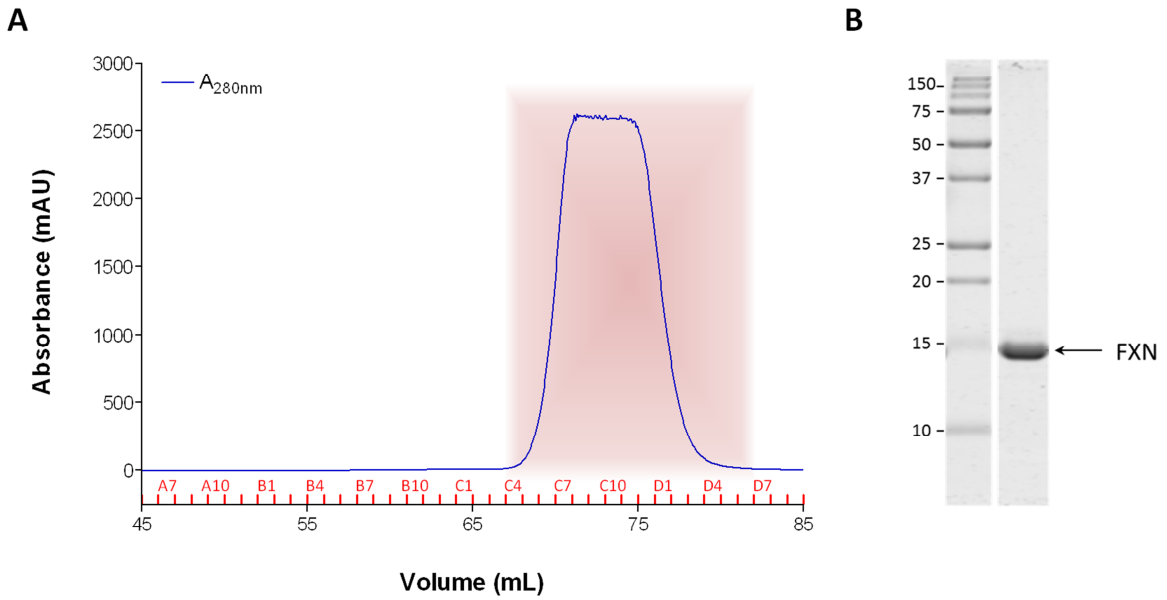


Figure III. 17. Purification de la protéine FXN sur la colonne Superdex 75. A. Chromatogramme acquit pendant l'élution des protéines sur la colonne de Superdex 75. L'arrière-plan rose représente les fractions récupérées contenant la protéine FXN. **B**. SDS-PAGE 14 % montrant la protéine FXN purifiée. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Le gel SDS-PAGE montre que la protéine FXN est pure à 99 %, avec un rendement moyen de 100 mg de protéine par litre de culture (**Figure III. 17**, **B**). L'analyse de la protéine FXN par spectrométrie de masse en protéine entière montre un pic unique à 14 411 Da qui est cohérent avec la masse attendue de FXN (79-207) à 14 410,8 Da (Cf. Chapitre V). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus pour le mutant R162A de FXN.

A . 2 . 4 . Purification des protéines FDX2 et GLRX5

Nous avons également étudié les propriétés de deux protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe/S comme réductases de persulfures (Cf. Chapitre V). La ferrédoxine, FDX2, qui contient un centre [2Fe-2S] capable de transférer des électrons à ses partenaires et la glutarédoxines 5, GLRX5, qui est impliquée dans le transfert de centres Fe/S et pourrait jouer un rôle de réductase dans sa forme apo-protéine. Les protéines FDX2 et GLRX5 ont également été surexprimées dans des bactéries compétentes Rosetta2 (DE3) ; et le protocole de purification de ces protéines est similaire à celui décrit pour ISCU et FXN.

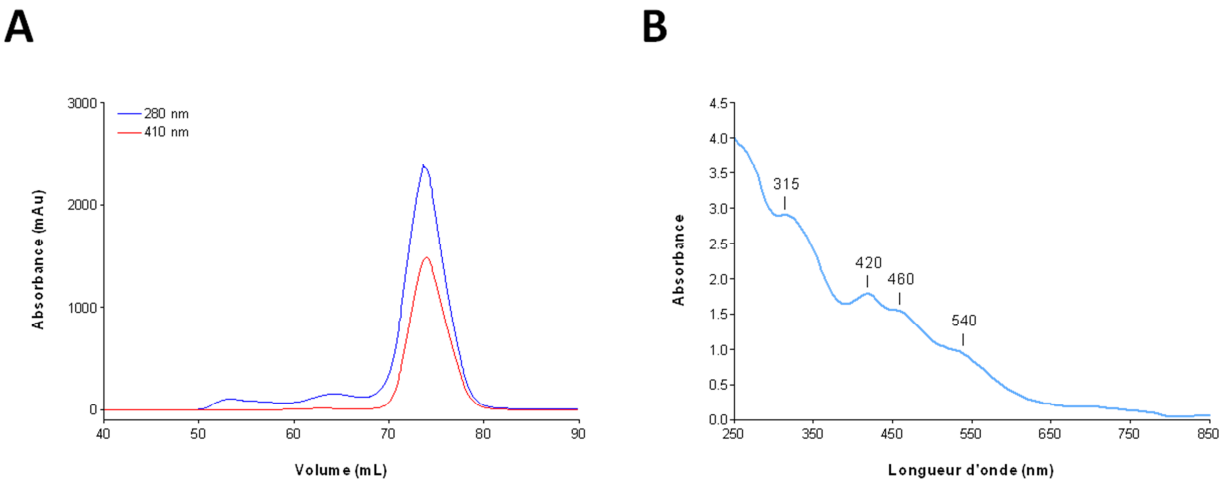


Figure III. 18. Purification de la protéine FDX2 par chromatographie d'exclusion de taille et caractérisation par UV-visible. A. Chromatogramme acquit pendant l'élution des protéines sur la colonne Superdex 75. **B**. Spectre UV-visible de la protéine FDX2 purifiée.

Très brièvement, il faut noter que la protéine FDX2 est produite et purifiée avec un centre [2Fe-2S] (**Figure III. 18**), ce qui se caractérise par une absorbance à 410 nm qui concorde avec l'absorbance à 280 nm lors de l'élution de la protéine sur Superdex 75.

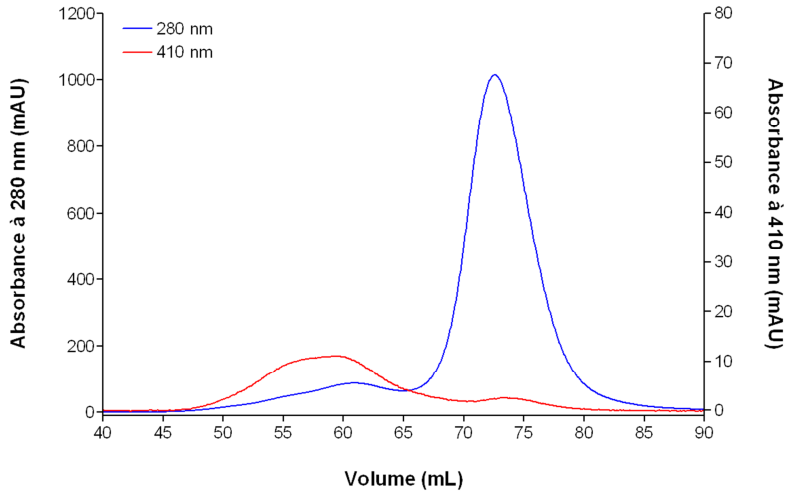


Figure III. 19. Purification de la protéine GLRX5 par chromatographie d'exclusion de taille. Chromatogramme acquit pendant l'élution des protéines sur la colonne Superdex 75.

La protéine GLRX5 est purifiée sous une forme « apo-GLRX5 » majoritaire, avec un volume de rétention vers 73 mL correspondant à un monomère ; et sous des formes minoritaires « holo-GLRX5 », dimérique et tétramérique (volume d'élution de 63 mL et 55 mL), qui contiennent probablement un centre [2Fe-2S] (**Figure III. 19**). Nous avons uniquement étudié l'activité réductase de la forme « apo-GLRX5 ».

B . Etude de la formation des complexes entre les protéines NFS1, ISD11, ISCU et FXN

Les équipes de David Barondeau, d'Hélène Puccio/Sandrine Ollagnier-de-Choudens et de John Markley ont démontré par différentes méthodes la formation de deux types de complexes homodimériques entre NFS1, ISD11, ISCU et FXN ; un complexe ternaire dans un rapport NI:U de 1:1 et de formule globale $(NIU)_2$, que nous noterons NIU par la suite, et un complexe quaternaire dans un rapport NI:U:F de 1:1:1 et de formule globale $(NIUF)_2$, que nous noterons ensuite NIUF (Tsai *et al.* 2010; Schmucker *et al.* 2011; Cai *et al.* 2013; Colin *et al.* 2013). Deux types de complexes quaternaires semblent avoir été détectés par ultracentrifugation analytique ; un complexe $(NIUF)_2$, comme décrit plus haut, et un complexe NIUF asymétrique, dans lequel une seule protéine FXN est liée, noté $(NIU)_2F$. Les constantes de dissociation de FXN pour ces complexes seraient de l'ordre de 2,6 µM pour le complexe $(NIU)_2F$ et de 10,3 µM pour le complexe $(NIUF)_2$, suggérant un effet contre-associatif (Colin *et al.* 2013). Les complexes NIU et NIUF ont également été observés dans

les cellules de levure par co-immunoprécipitation et GST pull-down sans que la stœchiométrie n'ait été déterminée (Gerber *et al.* 2003). Des complexes entre les protéines procaryotes homologues IscS, IscU et CyaY ont également été caractérisés *in vivo* et *in vitro* (Layer *et al.* 2007; Prischi *et al.* 2010). Des constantes de dissociation de 1,3 µM pour l'interaction IscS/IscU, 18,5 µM pour l'interaction IscS/CyaY et de 35 nM pour l'interaction de CyaY avec le complexe IscS/IscU, ont été déterminées (Prischi *et al.* 2010). Alors que l'interaction de FXN avec NFS1 semble dépendante de la présence d'ISCU chez les eucaryotes, l'interaction entre CyaY et IscS semble indépendante d'IscU chez les procaryotes (Layer *et al.* 2007; Prischi *et al.* 2010).

Nous avons recherché une méthode pour caractériser la formation des complexes NIU et NIUF, afin de confirmer que nos protéines recombinantes étaient fonctionnelles et pour étudier l'impact des mutations ponctuelles C35S, C61S, C104S, C104G et M106I d'ISCU et R162A de FXN, sur la formation de ces complexes. Nous nous sommes également intéressés à la formation du complexe NIF, caractérisé chez les procaryotes (Layer *et al.* 2006; Prischi *et al.* 2010) ; mais qui n'a encore jamais été observé chez les eucaryotes. Nous avons tout d'abord utilisé l'électrophorèse sur gel en conditions natives (non dénaturantes), le couplage chimique ou crosslink et la chromatographie d'affinité ; mais ces méthodes n'ont pas permis de caractériser la formation des complexes NIU et NIUF sans ambiguïté et seront donc décrites brièvement. Nous avons finalement utilisé la chromatographie d'exclusion stérique afin de caractériser ces complexes, bien qu'en raison de la dilution des échantillons au cours de l'élution, cette méthode ne nous était pas apparue comme la plus adaptée pour étudier des complexes en équilibre association/dissociation dynamique. Et pour terminer, des études cinétiques nous ont permis de déterminer la stœchiométrie en NFS-ISD11, ISCU et FXN dans ces complexes.

B . 1 . Etude de la formation des complexes par électrophorèse en conditions non dénaturantes

L'électrophorèse sur gel en conditions non dénaturantes, ou gel natif, a été utilisée par l'équipe de D. Barondeau (Tsai *et al.* 2010). Par cette méthode, ils ont observé la formation d'un complexe quaternaire NIUF et déterminé que le DTT favorise la formation de ce

complexe, contrairement au fer, et qu'un équivalent de la protéine FXN permet de former une quantité maximum de complexe.

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes permet de préserver les structures quaternaires des protéines et donc potentiellement les interactions entre protéines. Ainsi, on conserve la structure native des protéines et la migration se fait en fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la structure tridimensionnelle des protéines et/ou des complexes. Il faut noter que l'analyse de certaines protéines par gel natif s'avère difficile, car malgré toutes les précautions prises pour conserver la structure native des protéines, certaines sont plus sensibles que d'autres, et se dénaturent lors de la migration, ce qui se caractérise par des bandes diffuses sur le gel.

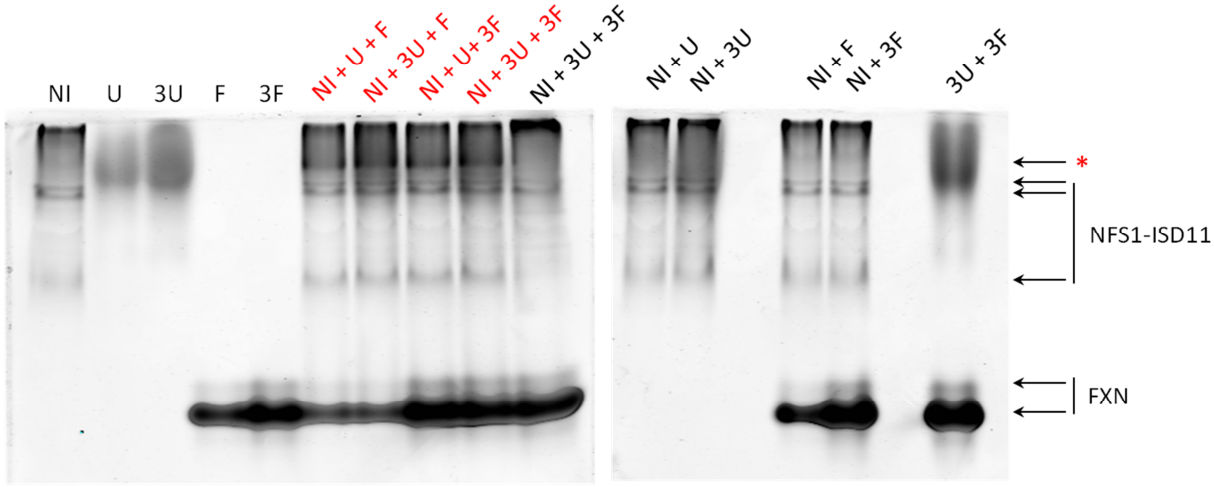


Figure III. 20. Analyse de la formation des complexes par gel natif. Gel 6,5% en conditions non-dénaturantes. Les protéines NFS1-ISD11 (NI, 20µg), ISCU (U, 5 µg et 3U, 15 µg) et FXN (F, 5 µg et 3F, 15 µg), ainsi que différents mélanges de ces protéines ont été incubés en présence de DTT, à l'exception du mélange NI + 3U + 3F (en noir). Le symbole * représente le complexe formé.

Afin de reproduire au mieux les conditions physiologiques de biogenèse des centres Fe/S avec notre système reconstitué *in vitro*, nous avons choisi de réaliser nos études à un pH de 8,0, qui correspond à celui de la matrice mitochondriale, dans laquelle se produisent les étapes primaires de l'assemblage des centres Fe/S par le complexe NFS1-ISD11-ISCU-FXN. Ces conditions seront également utilisées pour les autres méthodes d'analyse.

L'analyse du gel natif nous montre que le complexe NFS1-ISD11 est représenté par deux bandes nettes et une bande plus diffuse, et qu'une grande partie de la protéine ne pénètre pas dans le gel (**Figure III. 20**, puits NI). La protéine ISCU se distingue par une unique bande très diffuse dans le haut du gel (**Figure III. 20**, puits U et 3U) ; et la protéine FXN, avec un pH

isoélectrique acide (pHi ~ 5), migre majoritairement sous la forme d'une bande nette en bas du gel (**Figure III. 20**, puits F et 3F). L'analyse du mélange entre le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) et 1 à 3 équivalents d'ISCU et de FXN montre l'apparition d'une bande en haut du gel (désignée par un astérisque (*) sur la **Figure III. 20**). De plus, l'intensité de la bande correspondant à FXN dans les puits NI+U+F et NI+3U+F de la **Figure III. 20** diminue d'environ 30 % par rapport au puits F, ce qui indique qu'une certaine proportion de FXN est engagée dans un complexe. La bande caractérisant ce complexe (*) est absente lorsque le mélange des protéines est réalisé sans DTT (**Figure III. 20**, puits NI + 3U + 3F), ce qui confirme les résultats obtenus par l'équipe de D. Barondeau et suggère que la structure du complexe est sensible à l'oxydation. Etonnamment, les mélanges réalisés avec NFS1-ISD11 et ISCU ne semblent pas indiquer la formation d'un complexe NIU (**Figure III. 20**, puits NI+U, NI+3U). De même, l'analyse des mélanges contenant NFS1-ISD11 et FXN et ISCU et FXN ne montre pas de formation des complexes NIF et UF (**Figure III. 20**, puits NI+F, NI+3F et 3U+3F). Ces résultats suggèrent donc que l'analyse en conditions natives permet de caractériser le complexe quaternaire NIUF, mais pas le complexe NIU décrit dans d'autres études.

Cependant, ces expériences montrent qu'ISCU et FXN sont majoritairement sous une forme non complexée, ce qui indique que le complexe NIUF est formé en petite quantité à 25 µM. Mais cette interprétation n'est pas compatible avec la valeur de k_D de 10 µM déterminée par Colin *et al.*, pour laquelle plus de 50% de NFS1-ISD11, ISCU et FXN auraient dû être présent sous forme complexée à cette concentration (Colin *et al.* 2013). Il est donc probable que le complexe se dissocie au cours de l'électrophorèse. De plus, en augmentant les quantités d'ISCU et de FXN par rapport au complexe NFS-ISD11 jusqu'à trois équivalents, l'intensité de la bande correspondant au complexe (*) n'augmente pas ; ce qui remet en cause l'existence d'un équilibre d'association/dissociation entre l'espèce observée et les protéines ISCU et FXN. Au final, il est possible que l'espèce observée ne corresponde pas à un complexe NIUF. Nous nous sommes donc orientés vers une caractérisation par couplage chimique qui permet d'immobiliser les interactions protéine-protéine.

B . 2 . Etude de la formation des complexes par réaction de crosslink

L'utilisation d'un agent de couplage (ou crosslinker) permet de figer les interactions existantes entre deux ou plusieurs protéines. Le crosslinker réalise un lien covalent entre deux acides aminés, idéalement de deux protéines différentes, suffisamment proches. Il est composé à chaque extrémité, d'un groupement réactif, pouvant réagir avec les fonctions amines, thiols, carboxyles et alcools des acides aminés ; et d'un bras espaceur, placé entre ces deux groupements fonctionnels, d'une taille allant de 0 à ~ 100 Å. La spécificité d'une réaction de crosslink va dépendre du temps de réaction et de la taille du bras espaceur. Plus le bras est long, plus on augmente les chances d'obtenir un lien entre deux protéines ; mais également les risques de former un lien non spécifique entre ces deux protéines. C'est pourquoi il est intéressant de tester plusieurs agents de couplage pour évaluer leurs spécificités.

B . 2 . 1 . Le choix du crosslinker

Nous avons choisi des crosslinkers dont la réaction de couplage est optimale à pH 8,0 afin de caractériser la formation des complexes dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les réactions d'assemblage des centres Fe/S. Nous avons sélectionné deux familles d'agent de couplage qui remplissent cette condition ; les crosslinkers de type NHS ester (N-hydroxysuccinimide ester) qui réagissent avec les lysines et ceux de type maleimide qui réagissent avec les thiols. Parmi ceux-là nous avons testé des crosslinkers homo- et hétéro-bi-fonctionnels avec différentes tailles d'espaceur (entre 6 Å et 11 Å environ), solubles ou non dans l'eau.

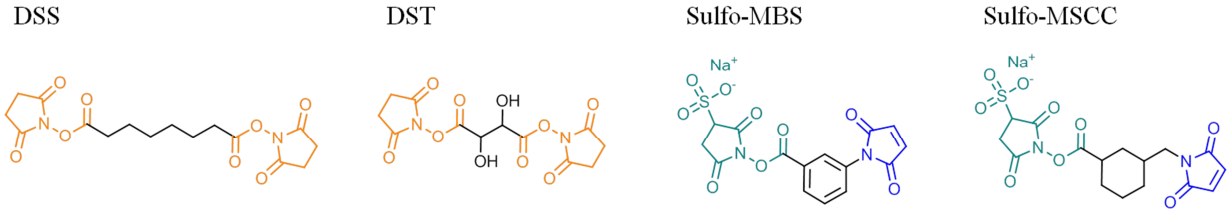


Figure III. 21. Structures des quatre crosslinkers utilisés pour l'étude de la formation des complexes. Les fonctions NHS ester du DSS et du DST sont colorées en orange, les fonctions maléimides et sulfo-NHS ester du sulfo-MBS et du sulfo-MSCC sont respectivement en bleu et en vert.

Nous avons testé deux crosslinkers homo-bi-fonctionnels de type NHS-ester ; le DSS (disuccinimidyl sulerate) et le DST (disuccinimidyl tartrate) qui possèdent des bras espaceurs de 11,4 Å et 6,4 Å respectivement (**Figure III. 21**). Cependant, ces agents de couplage ne sont pas solubles dans l'eau, mais uniquement dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde) ou le DMF (diméthyl furane), qui pourraient interférer avec l'assemblage des complexes. Nous avons donc testé des crosslinkers rendus hydrosolubles grâce à un groupement « sulfo ». Nous avons sélectionné deux crosslinkers hétéro-bi-fonctionnels hydrosolubles ; le sulfo-MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester) et le sulfo-MSCC (sulfosuccinimidyl-4-[N-maléimidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate) composés d'un groupement NHS ester à une extrémité et d'un groupement maléimide à l'autre extrémité (**Figure III. 21**). Le sulfo-MBS et le sulfo-MSCC possèdent des bras espaceurs respectivement de 7,3 Å et de 8,3 Å. Enfin, les protéines ISD11 et FXN étant dépourvues de résidus cystéines, l'utilisation de ces crosslinkers hétéro-bi-fonctionnels ne régissant avec les thiols que par une seule de leur extrémité devrait permettre de limiter les possibilités de couplage entre les quatre protéines et donc augmenter la spécificité.

B . 2 . 2 . Réaction de couplage

Ces quatre crosslinkers ont été testés sur des mélanges contenant le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) en présence d'un équivalent d'ISCU, avec ou sans un équivalent de la protéine FXN**.**

Les gels SDS-PAGE, révélés au bleu de Coomassie, de la réaction de couplage par le DSS, le DST et le Sulfo-MBS dans un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 et la protéine ISCU en absence de FXN montrent chacun une disparition quasi-totale de la bande correspondant à la protéine ISCU et la présence de plusieurs bandes de hauts poids moléculaires (**Figure III. 22**, puits T, pour ternaire). En présence de FXN, les gels SDS-PAGE montrent une disparition importante mais partielle de la bande correspondant à la protéine FXN et/ou ISCU, plus marquée avec le DSS (**Figure III. 22**, puits Q, pour quaternaire). L'analyse par western blot montre qu'ISCU et FXN sont majoritairement présentes dans des espèces de poids moléculaires supérieurs à 70 kDa, compatible avec un complexe quaternaire (> 85 Da). Cependant, la présence de plusieurs bandes, et donc de plusieurs espèces, ne nous a pas permis de mettre en évidence la formation de complexes NIU et NIUF ; car un très grand

nombre d'autres combinaisons sont possibles, comme par exemple, les interactions entre plusieurs protéines identiques, NFS1, ISCU ou FXN. Afin de caractériser ces différentes espèces complexes, nous aurions dû les séparer et les analyser séparément par spectrométrie de masse, par exemple, et réaliser un grand nombre de contrôles avec les protéines seules. Face à la complexité de cette méthode, nous avons préféré renoncer au couplage chimique et nous nous sommes orientés vers l'analyse par chromatographie d'affinité.

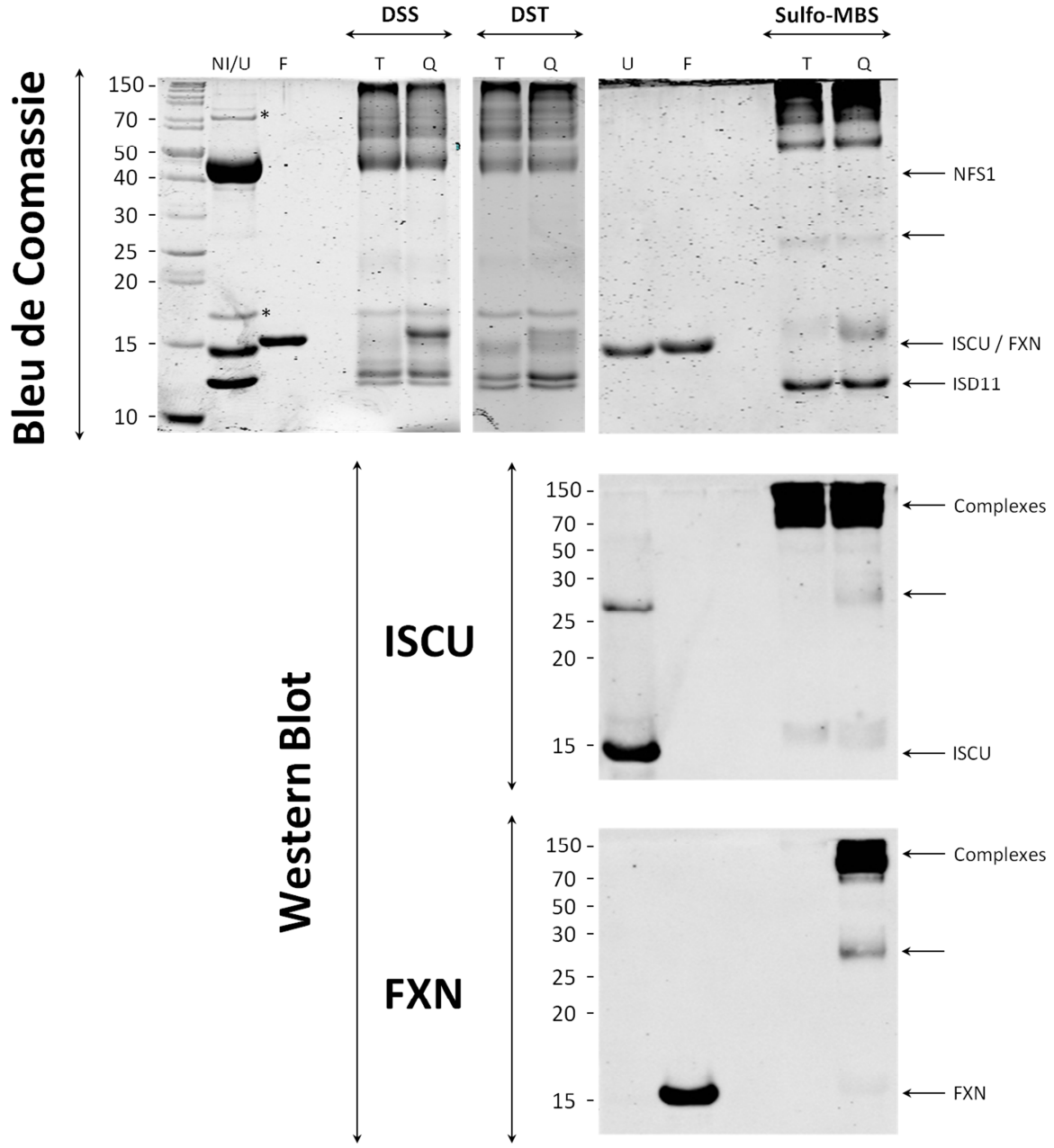


Figure III. 22. Etude de la formation des complexes avec différents crosslinkers. Gels SDS-PAGE 14 % et analyses western blot de l'étude de la formation des complexes ternaires (T) et quaternaires (Q) avec trois crosslinkers, le DSS, le DST et le Sulfo-MSB. Les protéines ISCU (U), FXN (F) ou un mélange des protéines NFS1-ISD11 et ISCU (NI/U) ont également été déposés sur le gel. Le symbole * correspond à deux impuretés présentes dans la solution protéique du complexe NFS1-ISD11. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

B . 3 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité

Nous avons choisi la chromatographie d'affinité en utilisant NFS1 comme cible pour capturer les complexes, car cette protéine possède toujours son étiquette poly-histidine. Si une interaction existe entre le complexe NFS1-ISD11 et les protéines ISCU et FXN, elles seront co-éluées avec NFS1-ISD11 lors de la phase d'élution avec l'imidazole ; sinon, elles sortiront directement de la colonne pendant de la phase de lavage.

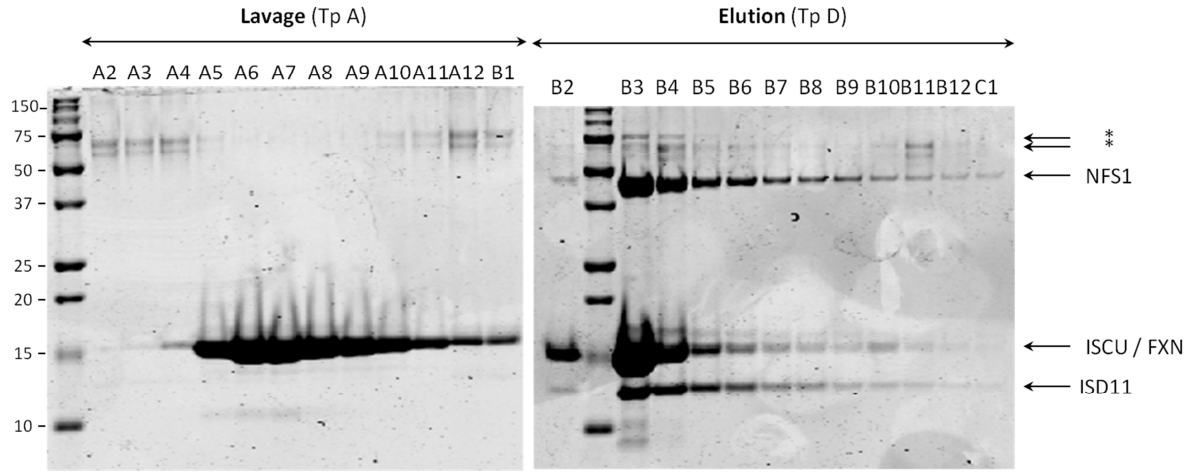


Figure III. 23. Etude de la formation des complexes par chromatographie d'affinité. SDS-PAGE 14 % correspondant aux fractions récoltées (0,5 mL) lors des phases de lavage et d'élution. Les symboles * correspondent aux impuretés du complexe NFS1-ISD11 purifié. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Le complexe NFS1-ISD11 (45µM), est incubé une heure à température ambiante en présence de 2,5 équivalents d'ISCU et 5 équivalents de FXN avant d'être injecté sur la colonne de nickel. Le tampon de charge (tampon A) contient 5 mM d'imidazole, pour éviter les interactions non-spécifiques entre les protéines et la colonne. Après l'injection, la colonne est lavée avec 10 mL de tampon de charge (tampon A) puis les protéines retenues sur la colonne sont éluées avec 10 mL de tampon d'élution (tampon D), contenant 100 mM d'imidazole. L'analyse SDS-PAGE des fractions récoltées montre qu'une certaine quantité de protéines, correspondant à ISCU et/ou FXN, n'est pas retenue sur la colonne lors du lavage ; tandis que le complexe NFS1-ISD11 reste entièrement fixé (**Figure III. 23**, **Lavage**). A noté que les impuretés, initialement présentes dans les préparations du complexe NFS1-ISD11 (repérées par *) ne sont plus retenues sur la colonne, alors que celles-ci étaient co-éluées au cours de la purification du complexe NFS1-ISD11 sur colonne de nickel. Cette observation

suggère que ces impuretés étaient associées à NFS1-ISD11 et qu'elles s'en dissocient en présence de FXN et/ou ISCU, potentiellement en raison de la formation de complexes. L'élution des protéines FXN et/ou ISCU lors de la phase de lavage était attendue car elles ont été ajoutées en excès par rapport à NFS1. L'analyse des fractions récoltées lors de l'élution par l'imidazole montre la présence à la fois du complexe NFS1-ISD11 et d'ISCU et/ou de FXN, ce qui suggère qu'un ou plusieurs complexes se sont formés (**Figure III. 23**, **Elution**).

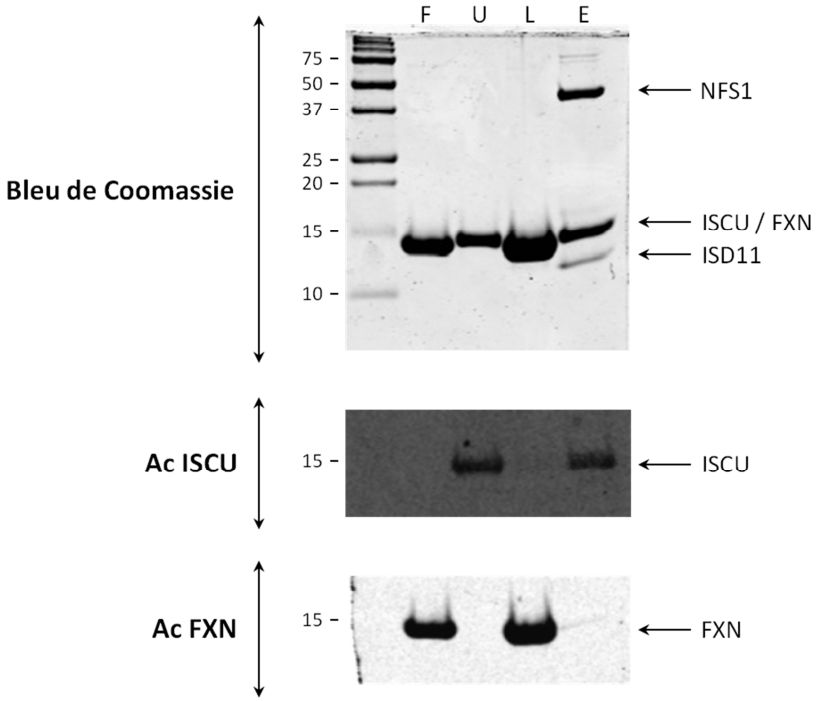


Figure III. 24. Identification des protéines ISCU et FXN par western blot après analyse sur la colonne de nickel. SDS-Page 14 %, coloré au bleu de Coomassie après l'étape de transfert, et analyses western blot correspondant aux fractions récoltées au cours de la phase de lavage (L) et d'élution (E) de la **Figure III. 23**. Les protéines purifiées ISCU (U) et FXN (F) ont également été déposées sur le gel. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Nous avons ensuite réuni les fractions correspondant aux phases de lavage et d'élution et nous les avons analysées par western blot. Les résultats indiquent que les fractions obtenues lors du lavage comportent exclusivement FXN (**Figure III. 24**, L, pour lavage) ; alors que les fractions correspondant aux protéines éluées par l'imidazole contiennent très majoritairement ISCU et une très faible proportion de FXN (**Figure III. 24**, E, pour élution). Ces résultats semblent donc indiquer la formation d'un complexe NIU et, en très faible quantité, la formation d'un complexe NIUF.

Cependant, l'absence d'ISCU dans les fractions de lavage, qui pourtant a été ajoutée en excès, et l'intensité de la bande d'ISCU dans les fractions d'élution qui est plus forte que celle de NFS1 indiquent que plus d'une protéine ISCU, par rapport au complexe NFS1-

ISD11, est retenue sur la colonne. L'analyse des fractions d'élution indiquent que la proportion d'ISCU par rapport à NFS1 n'est pas la même dans les différentes fractions passant d'un rapport NFS1:ISCU de 1:10 pour le puits B3 ; 1:5 pour le B4 ; 1:2 pour le B5 à 1:1 pour le reste des fractions (**Figure III. 23**). Ces résultats suggèrent soit que plus d'une protéine ISCU est capable de se complexer à NFS1, soit que la protéine ISCU s'accroche directement à la colonne, même en présence de 5 mM d'imidazole. D'après les profils d'élution obtenus après le clivage de l'étiquette poly-histidine d'ISCU, nous avons constaté que l'élution de la protéine ISCU nécessitait le passage de cinq volumes de colonne (25 mL) de tampon contenant 5 mM d'imidazole (Tampon A), ce qui suggère qu'ISCU est capable de s'accrocher sur la colonne de nickel.

Il semble donc que ces conditions ne permettent de caractériser ni le complexe NIU, ni le complexe NIUF sans ambigüité. Nous avons donc cherché à optimiser ces conditions.

B . 3 . 1 . Influence de l'imidazole dans l'interaction entre FXN et NIU

L'imidazole pourrait interférer dans l'interaction entre la protéine FXN et le complexe NIU. Malheureusement, en absence d'imidazole, nous avons remarqué que la protéine FXN est retenue sur la colonne (non montré). Nous avons donc cherché la concentration minimale d'imidazole requise pour éviter la fixation aspécifique de la protéine FXN sur la colonne de nickel et nous avons déterminé qu'une concentration de 800 µM d'imidazole était suffisante. Cependant à cette concentration en imidazole, nos expériences montrent que la protéine FXN est toujours majoritairement éluée lors de la phase de lavage (non montré).

B . 3 . 2 . Influence du fer et de la L-cystéine dans la formation du complexe NIUF

Nous avons également étudié la formation du complexe quaternaire en présence de L-cystéine, car il été proposé que Yfh1 stimule la fixation de L-cystéine à Nfs1 (Pandey *et al.* 2013), et d'ions Fe^{2+} ; car il a été montré chez la levure, que la formation du complexe NIUF est favorisée en présence de fer (Gerber *et al.* 2003). Le complexe NFS1-ISD11 (10 µM) et 2 équivalents d'ISCU et de FXN a été incubé avec du fer ou de la L-cystéine. Nous avons

constaté qu'en présence de fer et de L-cystéine, FXN est systématiquement retrouvée dans les fractions correspondant au lavage de la colonne de nickel, indiquant que ni le fer ni la L-cystéine n'ont d'effet sur l'interaction entre FXN et le complexe NIU à cette concentration.

Ainsi, cette méthode semble indiquer qu'un complexe NIU se forme ; mais la fixation directe d'ISCU sur la colonne de nickel, même en présence de 5 mM d'imidazole, ne nous permet pas de conclure sans ambigüité sur la formation de ce complexe. Par cette méthode, nous ne sommes parvenus à détecter qu'une quantité infime de complexe NIUF. La première hypothèse serait que celui-ci est formé en quantité très faible à 45 µM, mais à nouveau ce résultat n'est pas compatible avec la constante de dissociation de 10 µM déterminée par Colin *et al*.. La seconde hypothèse est que l'imidazole interfère avec la formation du complexe NIUF. Il semble donc que la chromatographie d'affinité dans ces conditions ne soit pas adaptée pour la caractérisation des complexes NIU ou NIUF. Nous nous sommes alors tournés vers la chromatographie d'exclusion stérique pour nous affranchir de l'imidazole.

B . 4 . Etude de la formation des complexes par chromatographie d'exclusion stérique

Nous nous sommes intéressés à l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique, qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille, car les complexes NIU, NIF et NIUF ont des poids moléculaires attendus différents des protéines isolées. De plus, cette technique a été précédemment utilisée par d'autres équipes pour caractériser ces complexes (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013). Pour cela, nous avons utilisé une colonne Superdex 200 10/300 dite analytique qui permet de diminuer la quantité d'échantillon à injecter et le temps d'élution par rapport à une colonne préparative (16/600), et donc de limiter aussi la dissociation des complexes.

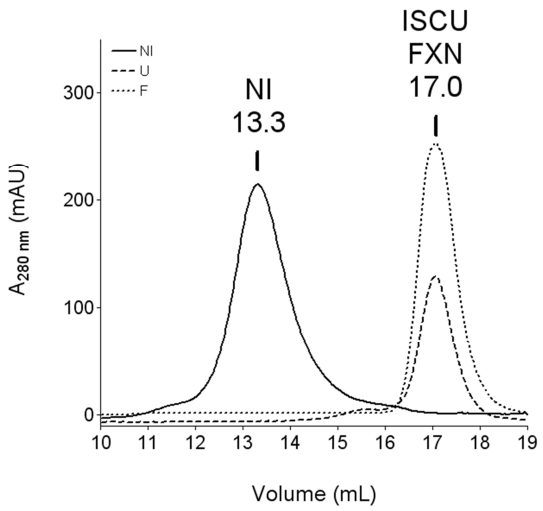


Figure III. 25. Profil d'élution des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique du complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et des protéines ISCU et FXN (20 µM).

L'analyse du complexe NFS1-ISD11 et des protéines ISCU et FXN montre que les volumes d'élution du complexe par rapport aux protéines ISCU et FXN isolées sont très différents, avec respectivement 13,3 mL et 17,0 mL (**Figure III. 25**).

B . 4 . 1 . Analyse du complexe NIU

Nous avons analysé un mélange du complexe NFS1-ISD11 (20 µM) avec un équivalent de la protéine ISCU. Le chromatogramme obtenu présente deux pics majoritaires avec des volumes de rétention de 12,8 mL et 16,9 mL (**Figure III. 26 (A)**).

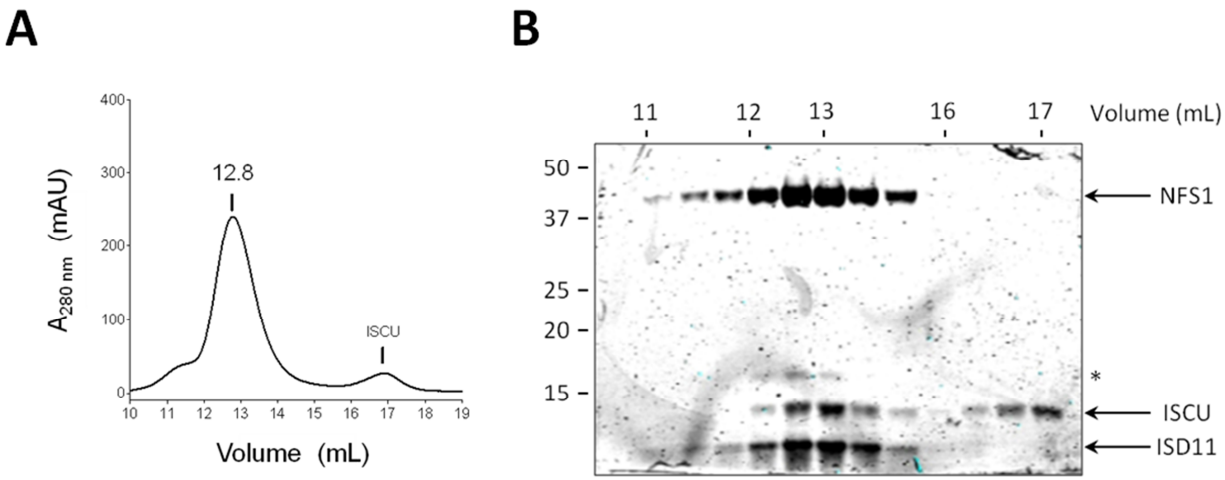


Figure III. 26. Caractérisation du complexe NIU. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et ISCU (20 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Le décalage du volume de rétention du premier pic vers de plus petits volumes, avec 12,8 mL, indique que des espèces de plus haut poids moléculaire que le complexe NFS1-ISD11 (13,3 mL) sont éluées. L'analyse SDS-PAGE indique que la protéine ISCU co-élue avec le complexe NFS1-ISD11 dans le premier pic et que le second pic, à 16,9 mL, contient de la protéine ISCU non complexée (**Figure III. 26** (**B**)). Ces résultats confirment l'existence d'une interaction entre le complexe NFS1-ISD11 et la protéine ISCU précédemment observée lors de l'analyse par chromatographie d'affinité. Cependant, la quantification des bandes correspondant à ISCU, NFS1 et ISD11, montre des proportions NFS1:ISCU d'environ (2:1), suggérant donc que le complexe NIU se dissocie partiellement au cours de l'élution, probablement à cause de la dilution de l'échantillon, passant de 300 µL à plus de 3 mL. De plus, la séparation des protéines complexées et non-complexées favorise probablement la dissociation du complexe. En sortie de colonne, les concentrations protéiques sont de l'ordre de 2 µM, ce qui est potentiellement proche de la valeur de K_D pour l'interaction entre NFS1-ISD11 et ISCU.

B . 4 . 2 . Analyse du complexe NIUF

Nous avons analysé la formation du complexe NIUF à partir d'un mélange contenant NFS1-ISD11 (20 µM) avec 2 équivalents d'ISCU et 5 équivalents de FXN. Cependant, nous n'avons pas observé de complexe dans ces conditions (non montré). Nous avons donc utilisé des concentrations plus importantes.

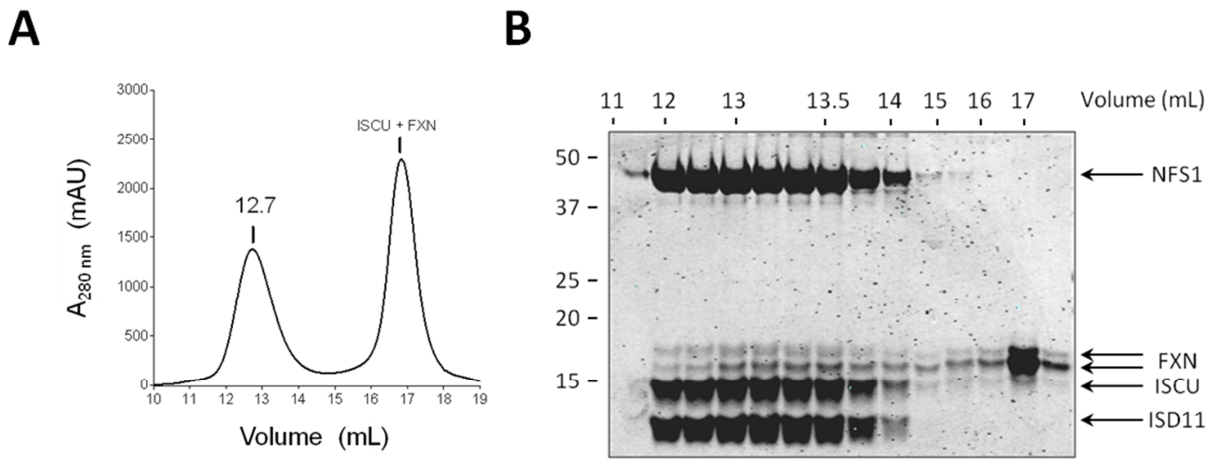


Figure III. 27. Caractérisation du complexe NIUF. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (100 µM) et les protéines ISCU (230 µM) et FXN (500 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Nous avons analysé un mélange contenant NFS1-ISD11 (100 µM) avec 2 équivalents d'ISCU et 5 équivalents de FXN. Le chromatogramme obtenu présente deux pics majoritaires avec des volumes de rétention de 12,7 mL et 16,9 mL (**Figure III. 27 (A)**). Le volume d'élution de 12,7 mL indique qu'une espèce de poids moléculaire supérieur à NFS1-ISD11 s'est formée. L'analyse SDS-PAGE montre que FXN co-élue avec NFS1-ISD11 et ISCU dans le premier pic à 12,7 mL (**Figure III. 27 (B)**). A noter, que nous avons utilisé la forme 6His-Thr-FXN de FXN pour pouvoir la distinguer d'ISCU sur gel SDS-PAGE. Cette forme de FXN apparait comme une double bande probablement en raison d'une α-N-gluconoylation (Cf. Partie A. 2. 3.). Ces résultats montrent clairement une interaction entre les protéines FXN et ISCU et le complexe NFS1-ISD11. Cependant, la quantité de complexe NIUF reste extrêmement faible.

B . 4 . 3 . Analyse du complexe NIF

L'interaction entre le complexe NFS1-ISD11 et la protéine FXN n'a encore jamais été démontré dans la littérature. L'équipe de D. Barondeau n'ayant observé aucun complexe avec trois équivalents de FXN par rapport au complexe NFS1-ISD11 (Tsai *et al.* 2010) ; nous avons décidé d'analyser un mélange entre NFS1-ISD11 (20 µM) et 10 équivalents de FXN par Superdex 200 analytique ; mais aucun complexe NIF n'a pu être détecté dans ces conditions (non montré). Cependant, tout comme pour le complexe NIU, il est possible que le complexe NIF se dissocie au cours de l'analyse.

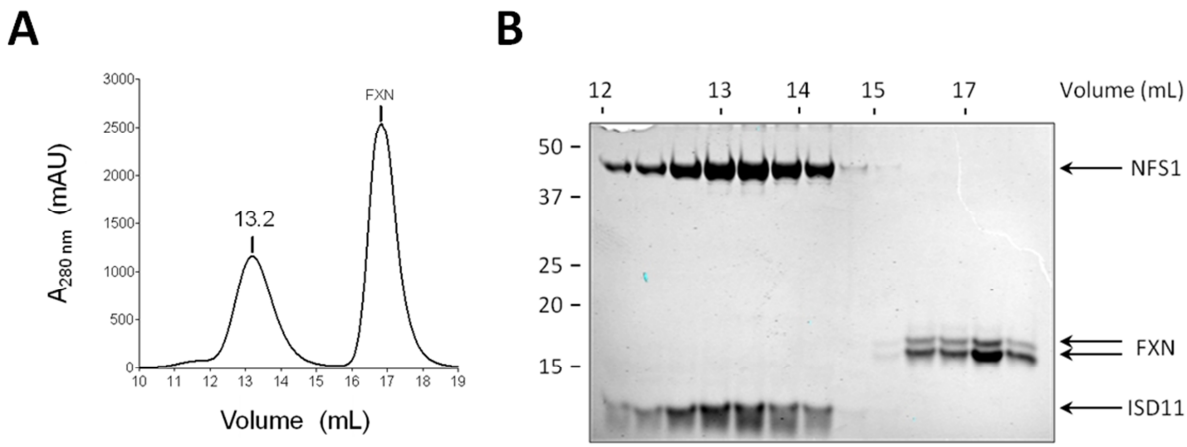


Figure III. 28. Caractérisation du complexe NIF. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (100 µM) et FXN (500 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Pour favoriser la formation d'un complexe NIF, nous avons augmenté la concentration de complexe NFS1-ISD11 à 100 µM, en présence de 5 équivalents de FXN. Le chromatogramme obtenu présente deux pics majoritaires avec des volumes de rétention de 13,3 mL et 16,85 mL (**Figure III. 28** (**A**)). Le volume de rétention du pic de plus haut poids moléculaire n'est pas modifié par rapport au complexe NI seul indiquant qu'aucun complexe ne s'est formé. L'analyse SDS-PAGE confirme que FXN ne co-élue pas avec le complexe NFS1-ISD11, indiquant que ce complexe n'interagit pas avec FXN (**Figure III. 28** (**B**)).

B . 5 . Détermination de la stœchiométrie des complexes par mesure de l'activité cystéine désulfurase

La chromatographie d'exclusion de taille nous a permis d'obtenir une caractérisation qualitative des complexes NIU et NIUF. Cependant, cette méthode ne nous a pas permis de déterminer les stœchiométries de ces complexes, en raison de la dissociation des complexes NIU et NIUF au cours de l'élution. Sachant qu'ISCU et FXN agissent sur l'activité cystéine désulfurase de NFS1, où ISCU induit une diminution et FXN une augmentation de cette activité (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013) ; nous avons utilisé la mesure d'activité cystéine désulfurase, qui est une méthode plus sensible que les autres méthodes que nous avons utilisé, pour déterminer la quantité minimale d'ISCU et FXN requise pour obtenir un effet maximal sur NFS1.

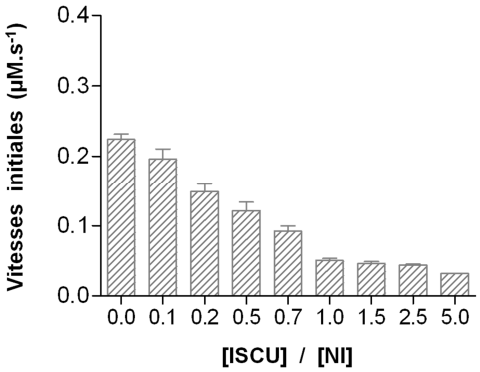


Figure III. 29. Détermination de la stœchiométrie du complexe NIU. Courbe dose-réponse de l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 (20 µM) avec une quantité croissante d'ISCU. L'activité cystéine désulfurase a été réalisée en présence de 1 mM de L-cystéine et de 2mM de DTT.

Tout d'abord, les activités cystéine désulfurase de NFS1 ont été mesurées avec des quantités croissantes d'ISCU (**Figure III. 29**). L'ajout de la protéine ISCU en quantité sous-

stœchiométrique montre une diminution progressive de la vitesse initiale de l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11. On constate qu'à partir d'un équivalent d'ISCU ajouté, l'influence de la protéine sur l'activité cystéine désulfurase est maximale. Ces résultats indiquent donc une stœchiométrie NI:U de 1:1 dans le complexe NIU.

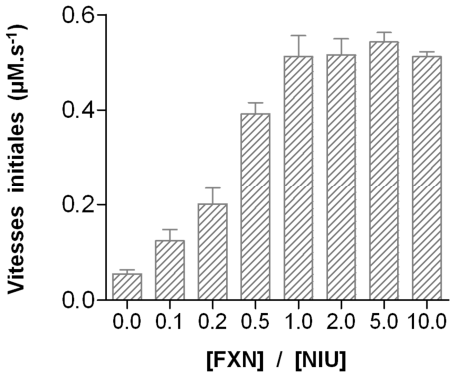


Figure III. 30. Détermination de la stœchiométrie du complexe NIUF. Courbe dose-réponse de l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11-ISCU (20 µM) avec une quantité croissante en FXN. L'activité cystéine désulfurase a été réalisée en présence de 1 mM de L-cystéine et de 2mM de DTT.

La stœchiométrie du complexe quaternaire a ensuite été déterminée en mesurant l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU (préparé avec un équivalent de NFS1-ISD11 et un équivalent d'ISCU) en présence de quantité croissante de FXN (**Figure III. 30**). La **Figure III. 30** montre que l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU est maximale dès l'ajout d'un équivalent de la protéine FXN, ce qui indique que le complexe quaternaire a une stœchiométrie de 1:1:1 pour NI:U:F.

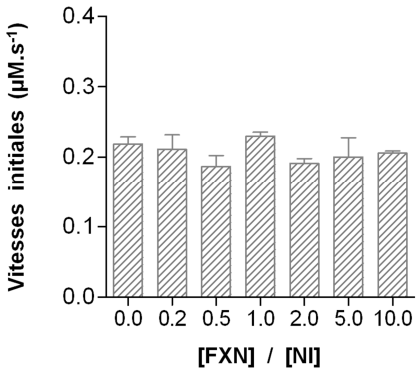


Figure III. 31. Détermination de la stœchiométrie du mélange NI + F. Courbe dose-réponse de l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 (20 µM) avec une quantité croissante en FXN. L'activité cystéine désulfurase a été réalisée en présence de 1 mM de L-cystéine et de 2mM de DTT.

Même s'il ne semble pas y avoir d'interaction entre le complexe NFS1-ISD11 et la protéine FXN, nous avons étudié l'influence de FXN sur l'activité cystéine désulfurase du

complexe NFS1-ISD11 (20 µM). La **Figure III. 31** montre que l'ajout de FXN jusqu'à 10 équivalents par rapport au complexe NFS1-ISD11 ne modifie pas l'activité cystéine désulfurase. Ces résultats suggèrent fortement que le complexe NIF ne se forme pas.

B . 6 . Formation des complexes ternaires et quaternaires avec les mutants d'ISCU et de FXN

La chromatographie d'exclusion de taille étant la meilleure méthode à notre disposition, nous avons utilisé cette technique pour étudier l'influence des mutations d'ISCU (C35S, C61S, C104S) sur la formation des complexes ternaires et quaternaires.

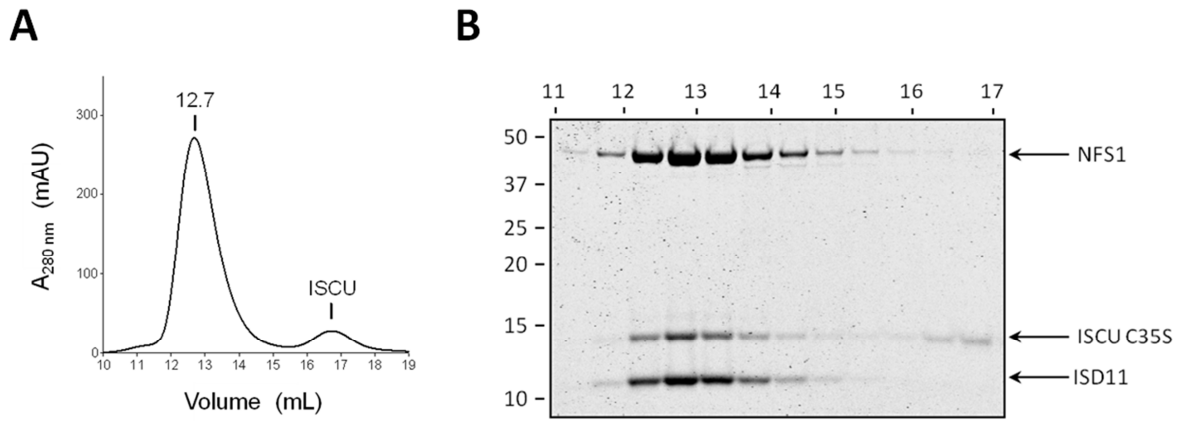


Figure III. 32. Caractérisation du complexe NIU^{C35S}. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et le mutant C35S d'ISCU (20 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

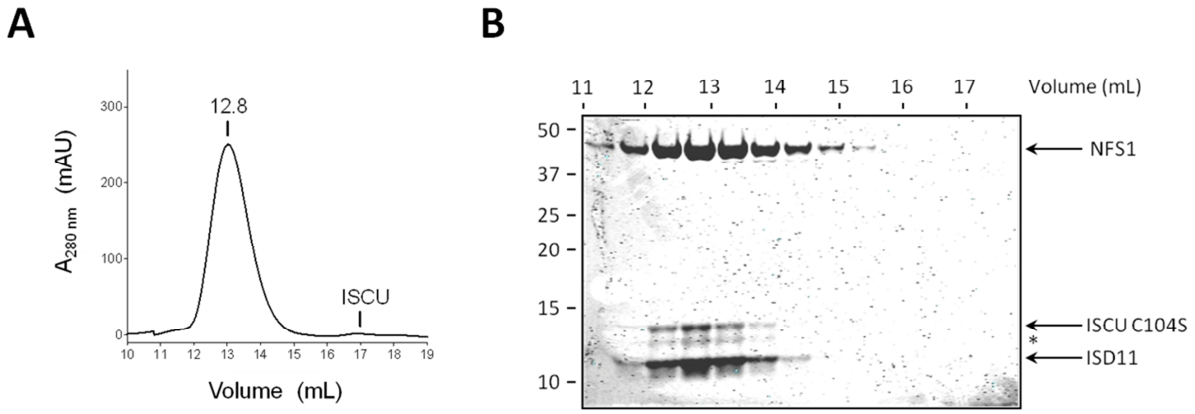


Figure III. 33. Caractérisation du complexe NIU^{C104S}. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et le mutant C104S d'ISCU (20 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Dans un premier temps, nous avons étudié la formation des complexes ternaires, en analysant différents mélanges entre le complexe NFS1-ISD11 et les mutants d'ISCU. Les chromatogrammes et les analyses SDS-PAGE obtenus montrent des résultats très similaires à ceux obtenus avec les protéines sauvages (**Figure III. 32** et **Figure III. 33**) ; à l'exception du mutant C61S d'ISCU, qui ne montre aucune interaction avec le complexe NFS1-ISD11 (**Figure III. 34**).

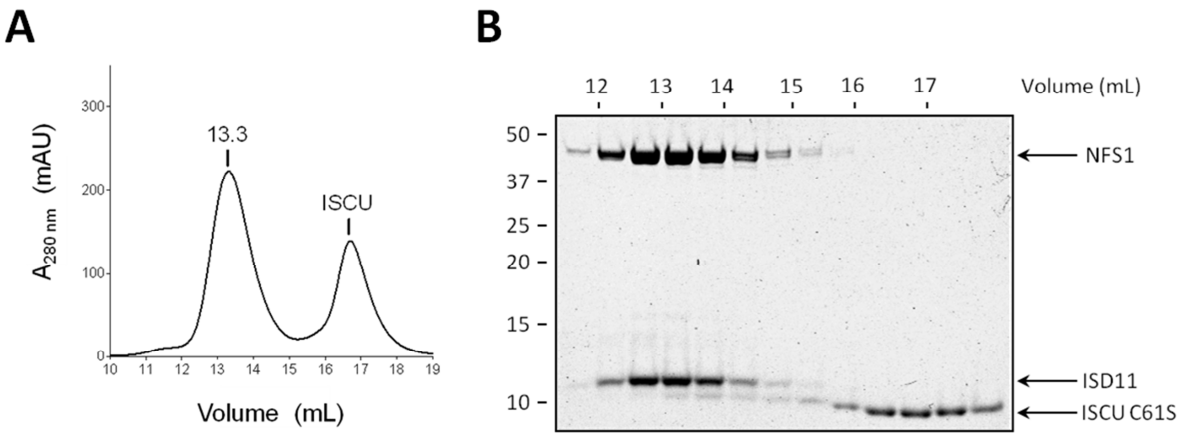


Figure III. 34. Caractérisation du complexe NIU^{C61S}. A. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) et le mutant C61S d'ISCU (20 µM). **B**. SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A**. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Faute de temps, nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier la formation des complexes ternaires avec les mutants C104G et M106I d'ISCU par chromatographie d'exclusion de taille. Cependant, en mesurant les activités cystéine désulfurase avec ces mutants, nous avons constaté que les mutants C104G et M106I d'ISCU induisent le même effet d'atténuation sur l'activité cystéine désulfurase de NFS1 que la protéine sauvage et le mutant C104S, indiquant que ces mutants interagissent avec le complexe NI (**Figure III. 35**).

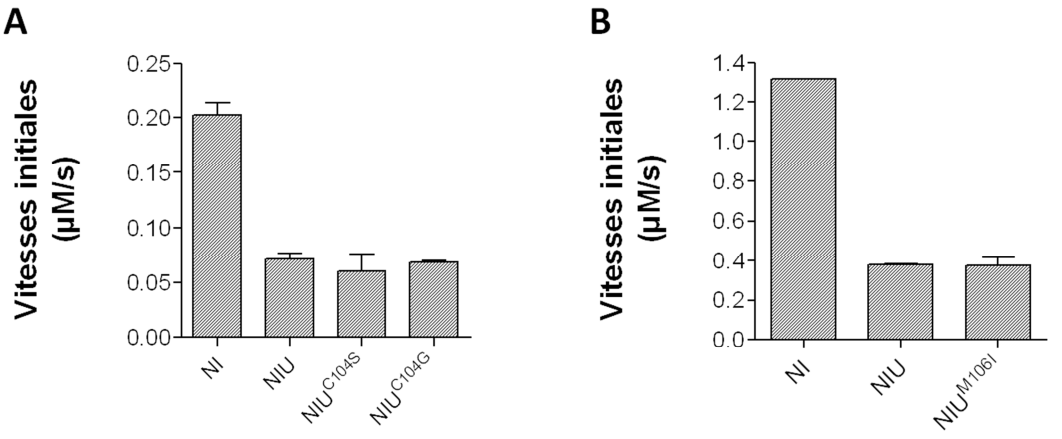


Figure III. 35. Vitesses initiales mesurées par les activités cystéine désulfurase des complexes NIU, NIU^{C104S}, NIU^{C104G} et NIU^{M106I}. A. Le complexe NI (20 µM) est incubé avec ISCU WT ou les mutants C104S et C104G d'ISCU, en présence de 500 µM de L-cystéine et 1 mM de DTT. **B**. Le complexe NI (20 µM) est incubé avec ISCU WT ou le mutant M106I d'ISCU, en présence de 20 mM de L-cystéine.

Ainsi, les mutations C35S et C104S d'ISCU n'altèrent pas la formation du complexe ternaire ; et il semble que ce soit également le cas pour les mutations C104G et M106I. L'absence d'interaction avec le mutant C61S est probablement due à la modification (de nature inconnue) de cette protéine.

Dans un second temps, nous avons étudié la formation des complexes quaternaires, en analysant différents mélanges contenant le complexe NFS1-ISD11, les mutants C35S et C104S d'ISCU et FXN. Nous avons décidé de ne pas caractériser la formation du complexe quaternaire avec le mutant C61S d'ISCU, du fait qu'il n'interagit pas avec le complexe NI. Les chromatogrammes et les analyses SDS-PAGE obtenus avec les mutants C35S et C104S d'ISCU ne montrent aucune interaction du complexe ternaire (NIU^{C35S} ou NIU^{C104S}) avec FXN (**Figure III. 36**).

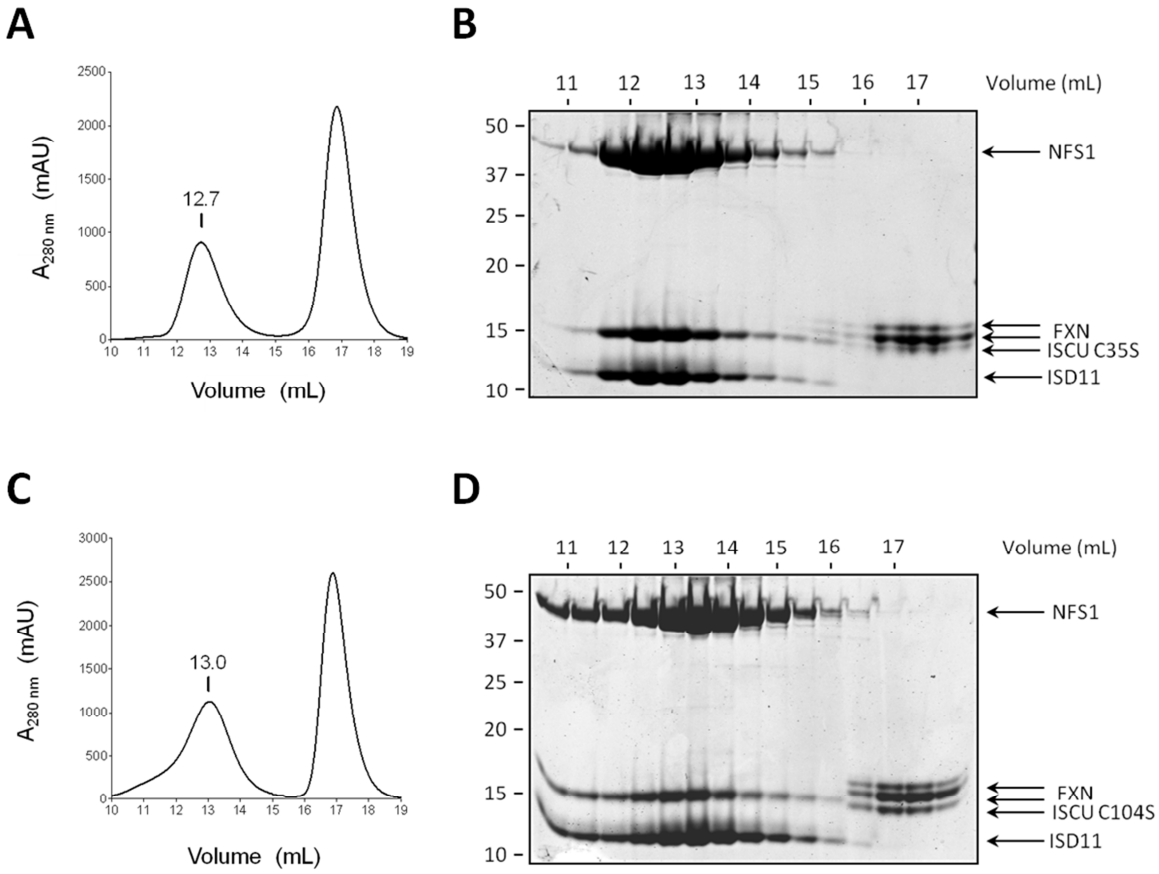


Figure III. 36. Caractérisation du complexe NIUF avec les mutants C35S et C104S d'ISCU. Profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse sur Superdex 200 Analytique d'un mélange contenant le complexe NFS1-ISD11 (100 µM), le mutant C35S (**A**) ou C104S (**C**) d'ISCU (200 µM) et la protéine FXN (500 µM). SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, correspondant au profil d'élution en **A** (**B**) et **C** (**D**). Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

De nouveau, faute de temps, l'étude de la formation des complexes quaternaires, avec les mutants C104G, M106I d'ISCU et le mutant R162A de FXN, n'a pas été réalisée par chromatographie d'exclusion de taille. Cependant, en mesurant les activités cystéine désulfurase avec les mutants C104S et C104G nous avons constaté que l'effet de FXN était totalement aboli (Cf. Chapitre V) probablement en raison de l'absence d'interaction entre FXN et les complexes NIU formés avec ces deux mutants ; par contre, nous avons constaté par d'autres expériences que les mutations M106I d'ISCU et R612A de FXN n'altèrent pas la formation des complexes quaternaires $NIU^{M106I}F$ et $NIUF^{R162A}$ (Cf. Chapitre V).

C . Discussion - Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons exposé les résultats de purifications du complexe NFS1-ISD11 et des protéines seules ISCU, FXN, FDX2 et GLRX5.

Nous avons exprimé la protéine NFS1 de souris 59-459 sous la forme d'un complexe avec la protéine ISD11, et nous avons cherché à exprimer une forme soluble de NFS1 en absence d'ISD11. Il a été montré que la forme (42-459) de NFS1 est retrouvée presque exclusivement dans les corps d'inclusion (Canal 2007). Nous avons tenté d'exprimer une forme mature plus longue de la protéine NFS1 (33-459), qui présente une homologie de séquence plus importante avec la forme mature de levure, Nfs1 (37-497), mais sans succès. Il semble donc que la protéine ISD11 soit essentielle pour éviter l'agrégation de la protéine NFS1 surexprimée. Les résultats de chromatographie d'exclusion de taille suggèrent que le complexe NFS1-ISD11 est un dimère. Une stœchiométrie de 2 ISD11 pour 1 NFS1 a été proposée sur la base d'analyses en spectrométrie de masse ESI-TOF des complexes NIU et NIUF (Colin *et al.* 2013). Cependant nos résultats de chromatographie d'exclusion de taille suggèrent une stœchiométrie de 3 ISD11 pour 1 NFS1. De plus, les dosages réalisés par deux méthodes différentes (Bradford et UV-visible, Cf. Chapitre II) sont en meilleur accord avec une stœchiométrie 3:1 que 2:1. Il est possible qu'ISD11 se dissocie du complexe dans les conditions d'analyse par spectrométrie de masses ou bien que nos mesures surestiment la quantité d'ISD11 par rapport à NFS1. En utilisant le coefficient d'extinction molaire correspondant à une stœchiométrie 1:3, nous avons déterminé que plus de 95 % de la protéine NFS1 possède son cofacteur PLP.

En ce qui concerne la production et la purification des protéines ISCU et FXN et de leurs mutants, nous avons constaté que l'étiquette poly-histidine avait été probablement modifiée par une α-N-gluconoylation, également détecté sur la protéine NFS1, lors de l'expression de ces protéines dans les bactéries Rosetta 2 (DE3). Cette modification a entrainé l'apparition de deux bandes distinctes sur nos gels SDS-PAGE. Après le clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine, ces protéines sont caractérisées par une unique bande sur gel, correspondant à une forme unique et homogène. Les analyses par chromatographie d'exclusion de taille montrent que les protéines ISCU (WT et mutants) et FXN (WT et mutant) sont obtenues sous forme de monomères. Le cas du mutant C61S d'ISCU est énigmatique, alors que la protéine migre avec un poids moléculaire apparent d'environ 10

kDa, les analyses par spectrométrie de masse indiquent que la protéine est entière et comporte un adduit de masse supérieur à 2 kDa, qui de manière étonnante entraine une migration plus rapide de la protéine, potentiellement en raison d'un repliement plus compact, avec la formation de liaisons covalentes intramoléculaires.

Dans la seconde partie, nous avons présenté différentes méthodes d'analyse des complexes NIU et NIUF. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes indique la formation d'une espèce qui pourrait être un complexe quaternaire, NIUF. Cependant, ce complexe ne semble pas en équilibre avec les protéines ISCU et FXN libres, ce qui met en doute l'identité de cette espèce. Les réactions de couplage quant à elles, semblent montrer la formation des complexes NIU et NIUF. Cependant, un grand nombre d'espèces couplées se forment et il n'a pas été possible de démontrer la formation de ces complexes sans ambiguïté. Nous avons ensuite étudié la formation des complexes par chromatographie d'affinité où le complexe NFS1-ISD11 a été utilisé comme appât. Mais en raison d'une possible interférence de l'imidazole dans l'interaction entre FXN et NFS1 et des interactions directes entre la colonne de nickel et ISCU ou FXN, malgré la présence d'imidazole, il n'a pas été possible de conclure quant à la formation de ces complexes.

Nous avons finalement analysé la formation des complexes par chromatographie d'exclusion stérique. Par cette méthode, nous avons mis en évidence un complexe ternaire entre NFS1-ISD11 et ISCU, et un complexe quaternaire, NIUF, mais en faible quantité, probablement en raison de la dissociation du complexe NIUF sur la colonne ; car la détection de celui-ci est sensible à la concentration initiale des protéines injectées sur la colonne. Enfin, nous avons constaté que FXN ne semble pas interagir avec le complexe NFS1-ISD11 en absence d'ISCU.

Finalement, nous sommes parvenus à montrer la formation de ces complexes, à une concentration de 20 µM, en mesurant l'activité cystéine désulfurase des complexes NIU et NIUF. Par cette méthode, nous avons déterminés des stœchiométries NI:U et NI:U:F de 1:1 et 1:1:1 dans les complexes ternaires et quaternaires. Ces stœchiométries sont identiques à celles déterminées précédemment par spectrométrie de masse (Colin *et al.* 2013).

L'ensemble de ces résultats nous permet d'estimer des valeurs de constante de dissociation (K_D) d'ISCU pour le complexe NI et de FXN pour le complexe NIU. Nous avons considéré des valeurs de 99 % à 80 % de complexe NIU et NIUF formés à 20 µM, afin de

tenir compte de l'incertitude potentielle de nos mesures. Avec ces valeurs, nous parvenons à des K_D compris entre 2 nM et 1 µM, respectivement. Ces résultats suggèrent donc que les K_D d'ISCU et de FXN, dans les complexes NIU et NIUF, sont inférieurs à 1 µM. Cette gamme de valeur est compatible avec les K_D déterminés pour le système bactérien, pour lequel un K_D de 35 nM a été mesuré pour l'interaction entre CyaY et le complexe IscS/IscU et de 1,3 µM pour l'interaction entre IscU et IscS, ce qui est cohérent avec une bonne conservation des rôles et des structures de ces deux protéines (Prischi *et al.* 2010). De plus, bien que la chromatographie d'exclusion de taille ne permette pas de mesurer des K_D avec précision, les résultats de ces expériences semblent indiquer qu'ISCU a une affinité plus importante pour le complexe NI, que FXN pour le complexe NIU étant donné les quantités respectives de complexes NIU et NIUF détectés par cette technique. Ces résultats suggèrent donc des différences importantes entre les systèmes bactériens et eucaryotes, et donc des modes d'interaction différents. Par contre, la valeur maximale de 1 µM, que nous avons estimé pour l'interaction entre FXN et NIU grâce aux mesures d'activité cystéine désulfurase, est significativement inférieure à celle de 10,3 µM mesurée par ultracentrifugation analytique pour l'interaction de FXN murin dans le complexe symétrique $(NIUF)_2$. Une telle valeur aurait conduit à la formation de seulement 50% du complexe NIUF à 20 µM. Une valeur de K_D < 1 µM est cependant cohérente avec celle de 2,6 µM mesurée pour le complexe asymétrique $(NIU)_2F$; alors que les stœchiométries que nous avons déterminé sont compatibles avec la formation d'un complexe symétrique $(NIUF)_2$. De plus, les effets atténuateur d'ISCU et stimulateur de FXN ont été observés à des concentrations de 1 µM avec des ampleurs comparables à celles que nous avons observées à 20 µM, par les groupes de D. Barondeau et H. Puccio (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013). Ces résultats indiquent clairement que les K_D d'ISCU et FXN pour les complexes NI et NIU sont probablement inférieurs à 1 µM. Ces résultats soulèvent donc la question de l'identité des complexes caractérisés par ultracentrifugation analytique. Le principe de cette méthode est similaire à celui de la chromatographie d'exclusion stérique. Il est basé sur la séparation des protéines et des complexes en fonction de leurs tailles, ce qui pourrait également provoquer une dissociation des complexes NIUF et NIU au cours de l'analyse. Nos résultats montrent également que FXN n'interagit pas avec le complexe NFS1-IS11 en absence d'ISCU, ce qui constitue une autre différence majeure par rapport au système bactérien (Prischi *et al.* 2010). Au final grâce à ces résultats, nous avons déterminé qu'une concentration de 20 µM était suffisante pour observer des effets maximaux de FXN et d'ISCU. Nous avons donc travaillé,

par la suite, à des concentrations protéiques égales ou supérieures à 20 µM dans toutes nos expériences.

Enfin, nous avons étudié l'impact des mutations C35S, C61S, C104S, C104G et M106I d'ISCU et R162A de FXN sur la formation des complexes ternaires et quaternaires. Les résultats montrent que les mutations C35S, C104S, C104G et M106I dans ISCU ne modifient pas l'interaction entre ISCU et le complexe NFS1-ISD11. Seule la mutation C61S semble altérer l'interaction, mais probablement en raison de la modification de nature inconnue portée par ce mutant. Nous avons ensuite observé que l'interaction entre la protéine FXN et les complexes NIU^{C35S}, NIU^{C104S} et NIU^{C104G} est abolit ; alors que le complexe NIU^{M106I} interagit avec FXN et le complexe NIU^{WT} avec le mutant R162A de FXN.

Chapitre IV

Etude des effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11

Chapitre IV. Etude des effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11

Avant de s'intéresser, dans le chapitre suivant, aux effets de la frataxine, nous avons analysé les effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11 ; car il a été montré qu'ISCU induit une diminution de l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 (Tsai *et al.* 2010; Bridwell-Rabb *et al.* 2011; Bridwell-Rabb *et al.* 2012; Colin *et al.* 2013). Nous avons cherché à déterminer le mécanisme par lequel ISCU agit sur le complexe NI. Pour cela, nous avons développé un test de détection des persulfures afin d'étudier indépendamment les réactions de formation et de réduction du persulfure de NFS1. Nous avons également cherché à caractériser un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU ; car chez les procaryotes, un transfert de soufre entre IscS et IscU a été mis en évidence par des expériences de spectrométrie de masse et par l'utilisation de L-cystéine-[^{35}S] (Smith *et al.* 2001; Urbina *et al.* 2001).

A . Etude des effets de la protéine ISCU sur le complexe NFS1-ISD11 par mesure de l'activité cystéine désulfurase

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre d'introduction, NFS1 est une cystéine désulfurase qui réalise la désulfurisation de la L-cystéine en L-alanine grâce à son cofacteur PLP (**Figure IV. 1**, réaction **1** et Cf. **Figure I. 9** du chapitre « Introduction bibliographique »).

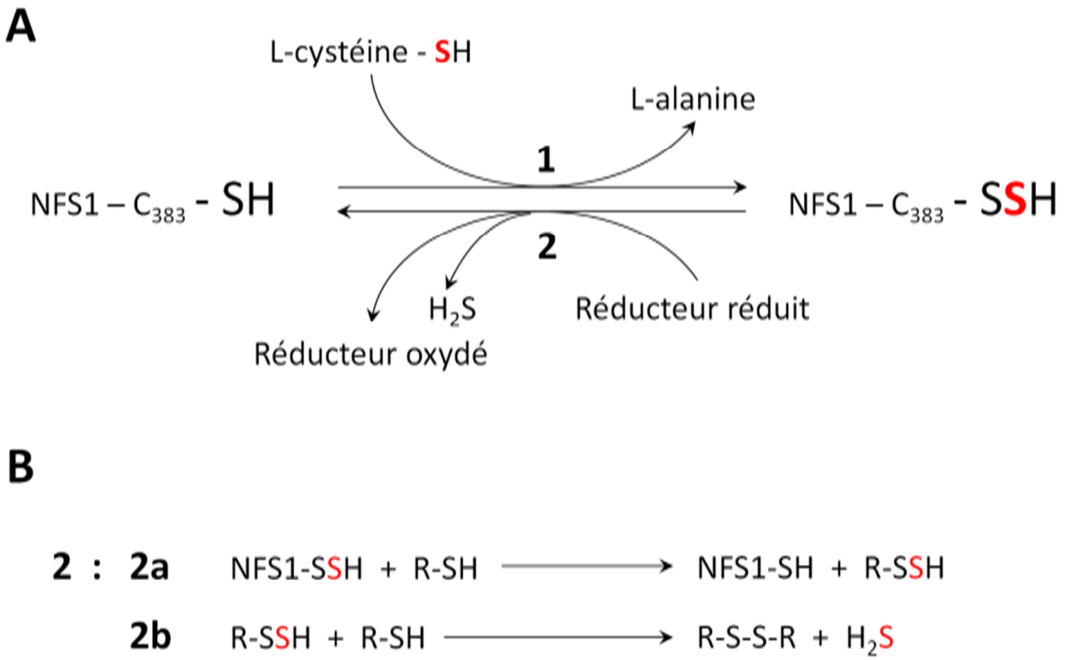


Figure IV. 1. Schéma des réactions de formation et de réduction du persulfure de la protéine NFS1. A. 1. Réaction de formation du persulfure de NSF1 sur la cystéine catalytique C383 et **2.** Réaction de réduction du persulfure de NFS1 par un réducteur qui génère du sulfure d'hydrogène. **B.** La réduction du persulfure de NFS1 se déroule en deux étapes : **2a.** La réduction de NFS1-SSH entraine la formation d'un persulfure sur le réducteur ; qui est à son tour réduit (**2b**) par une seconde molécule de réducteur pour libérer H_2S.

A l'issue de la réaction de NFS1 avec son substrat, la L-cystéine, un persulfure est formé sur la cystéine catalytique de NFS1 (C383 pour NFS1 de souris), que l'on note NFS1-SSH (**Figure IV. 1**, réaction **1**). Ce persulfure est ensuite réduit afin de générer les ions sulfures (S^{2-}), nécessaires à la constitution des centres Fe/S (**Figure IV. 1**, réaction **2**). De retour à son état initial, l'enzyme est prête pour un nouveau cycle catalytique (**Figure IV. 1**). Expérimentalement, des réducteurs à thiols, tel que le DTT, sont utilisés pour réduire le persulfure de NFS1. Le mécanisme de cette réaction en deux étapes est présenté **Figure IV. 1** (**B**). Le réducteur à thiol réagit avec le persulfure pour former un thiol persulfuré qui est ensuite réduit par une seconde molécule de réducteur (ou de manière intramoléculaire pour le DTT), conduisant à la formation de réducteur oxydé sous forme d'un pont disulfure et de H_2S.

L'activité cystéine désulfurase de NFS1 peut être mesurée en dosant soit le soufre généré lors de la réduction du persulfure de NFS1, soit la L-alanine, sous-produit de la réaction de formation de NFS1-SSH. Nous avons comparé ces deux méthodes ; en mesurant le soufre produit par un dosage colorimétrique, et l'alanine générée par réaction enzymatique.

Pour le dosage du soufre, nous avons suivi le protocole décrit par l'équipe de D. Barondeau, où la présence de soufre est révélée par la formation du bleu de méthylène à partir de la réaction des ions sulfures avec le DMPD (diméthyl phénylène diamine) en milieu oxydant ($FeCl_3$) (Tsai *et al.* 2010).

Pour le dosage de la L-alanine, nous nous sommes inspirés du protocole décrit par Colin *et al* (Colin *et al.* 2013). Cependant, nous avons constaté que lorsque la réaction est arrêtée par dénaturation thermique des échantillons à 99°C, comme utilisée par Colin *et al*, les quantités de L-alanine dosées sont supérieures de 20% à celles mesurées lorsque la réaction est arrêtée par choc acide dans l'acide trichloroacétique (TCA). Les raisons de cette surestimation (d'après nos constatations) sont probablement liées à 1) la réaction qui n'est pas stoppée immédiatement lorsque les tubes sont placés dans le bain sec à 99°C, car la précipitation des protéines survient quelques dizaines de secondes après ; alors que par choc acide la précipitation est immédiate ; et 2) l'augmentation de la température qui stimule l'enzyme pendant encore plusieurs secondes avant que les protéines ne soient dénaturées. Nous avons donc utilisé la dénaturation par choc acide dans l'acide trichloroacétique (TCA). La L-alanine est ensuite dosée par réaction enzymatique avec la L-alanine déshydrogénase (Cf. Chapitre II « Matériels et méthodes »).

Le complexe NFS1-ISD11 (20 µM), en présence ou en absence d'un équivalent d'ISCU, a été incubé avec de la L-cystéine et du DTT. Dans les deux cas, les résultats de dosage montrent qu'en présence d'ISCU la réaction est ralentie d'un facteur 2,5 environ. (**Figure IV. 2**).

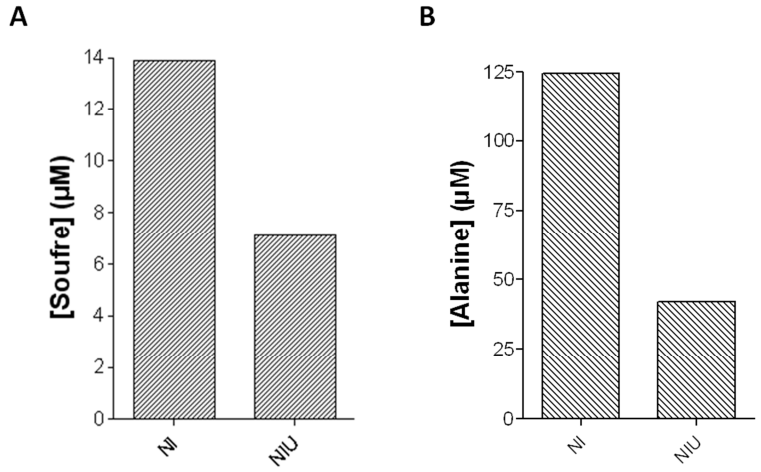


Figure IV. 2. Activité cystéine désulfurase des complexes NI et NIU. L'activité cystéine désulfurase de NFS1 dans les complexes NI et NIU (20 µM) , avec 500 µM de L-cystéine et 1 mM de DTT, a été mesurée en dosant le soufre (A) ou l'alanine (B) générés lors du test.

Cependant, les quantités de soufre et d'alanine mesurées sont très différentes, avec environ neuf fois moins de soufre que d'alanine. D'après le mécanisme décrit dans la **Figure IV. 1**. **B**, le soufre pourrait être généré en quantité plus faible que la L-alanine, si la réduction intra-moléculaire du DTT persulfuré n'est pas efficace. Il est également possible que les solutions de sulfure d'hydrogène ne soient pas stables ; car H_2S est un gaz. En milieux aqueux, le soufre existe sous trois espèces différentes, S^{2-}, HS^- et H_2S, selon le pH de la solution. La constante d'acidité (pKa) du couple H_2S/HS^- est d'environ 7 et celle du couple HS^-/S^{2-} est de 10. Sachant que l'activité cystéine désulfurase de NFS1 est mesurée à un pH de 8, le soufre accumulé au cours du test est majoritairement sous une forme HS^-, mais une certaine quantité du soufre est également sous la forme H_2S, qui pourrait donc être perdue par échange avec la phase gaz. Il est également possible que des oxydes de soufre se forment de type sulfites (SO_3^{2-}) et sulfates (SO_4^{2-}).

Nous avons analysé l'évolution de solution de sulfure de sodium (Na_2S, 50µM) en mesurant la quantité de soufre, après 5 et 60 minutes d'incubation à 25°C d'une solution fraichement préparée à partir de Na_2S solide. Nous avons dissous le Na_2S dans un tampon à pH 8,0, qui est le pH de nos réactions, et également dans une solution de soude à pH 10,0, qui devrait stabiliser ces ions HS^- et S^{2-}. Dans la soude (pH 10,0), la totalité du soufre initialement présent est retrouvé après 5 minutes d'incubation, et environ 30 % de soufre est perdu après 1 heure (**Figure IV. 3**). A pH 8,0, 50 % du soufre est perdu après seulement 5 minutes d'incubation et la solution continue à évoluer, avec 70 % de perte du soufre après 60 minutes. Bien que nous retrouvions l'effet inhibiteur d'ISCU attendu, ces résultats indiquent que malgré les précautions prises pour limiter les pertes de soufre en fermant nos tubes (Cf. Chapitre II), le soufre accumulé en solution ne peut pas être mesuré de manière fiable par cette méthode. Nous avons donc utilisé la méthode de dosage de la L-alanine.

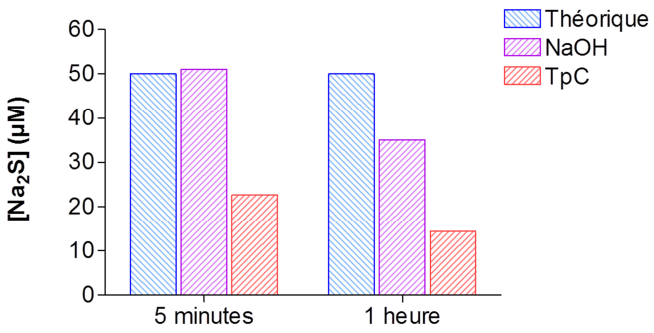


Figure IV. 3. Evolution de la quantité de soufre d'une solution de Na_2S à pH 10 et à pH 8. Le sulfure de sodium est dissous soit dans une solution de soude à 50 mM, soit dans le tampon C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl) à pH 8. Le soufre est dosé après 5 minutes et 1 heure d'incubation du Na_2S dans la soude ou le tampon C et la valeur obtenue est comparée avec la concentration théorique de soufre (50 µM).

Ces résultats confirment donc qu'en présence de la protéine ISCU l'activité cystéine désulfurase du complexe NI diminue. Pour savoir si lors de ces expériences en cycle multiple, ISCU agit sur la formation ou la réduction du persulfure de NFS1, ou bien sur les deux réactions simultanément, nous avons cherché un moyen d'étudier chaque réaction de manière indépendante.

B . Etude de la formation du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU

B . 1 . Etude de la formation du persulfure de NFS1 par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

B . 1 . 1 . Principe du test de détection des persulfures par l'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

Nous avons développé une nouvelle méthode de détection et de quantification des persulfures, permettant de réaliser des cinétiques, avec un nombre d'étape réduit. La principale difficulté pour la détection des cystéines persulfurées (cys-SSH) est de pouvoir discriminer les cystéines persulfurées des cystéines non modifiées, dites réduites (cys-SH) ; car les persulfures possèdent des propriétés très proches des cystéines réduites. Il est également nécessaire de distinguer les cystéines persulfurées des autres modifications des cystéines ; comme les cystéines oxydées sous la forme de ponts disulfures (-SS-), de sulfénamides (-SN-), d'acides sulféniques (-SOH), sulfiniques ($-SO_2H$) ou sulfoniques ($-SO_3H$). Notre test repose donc sur les propriétés spécifiques des persulfures qui possèdent à la fois un soufre terminal nucléophile, pouvant être alkylé par des agents spécifiques des cystéines tels que les maléimides ; et une liaison « -SS- », pouvant être clivée par un agent réducteur.

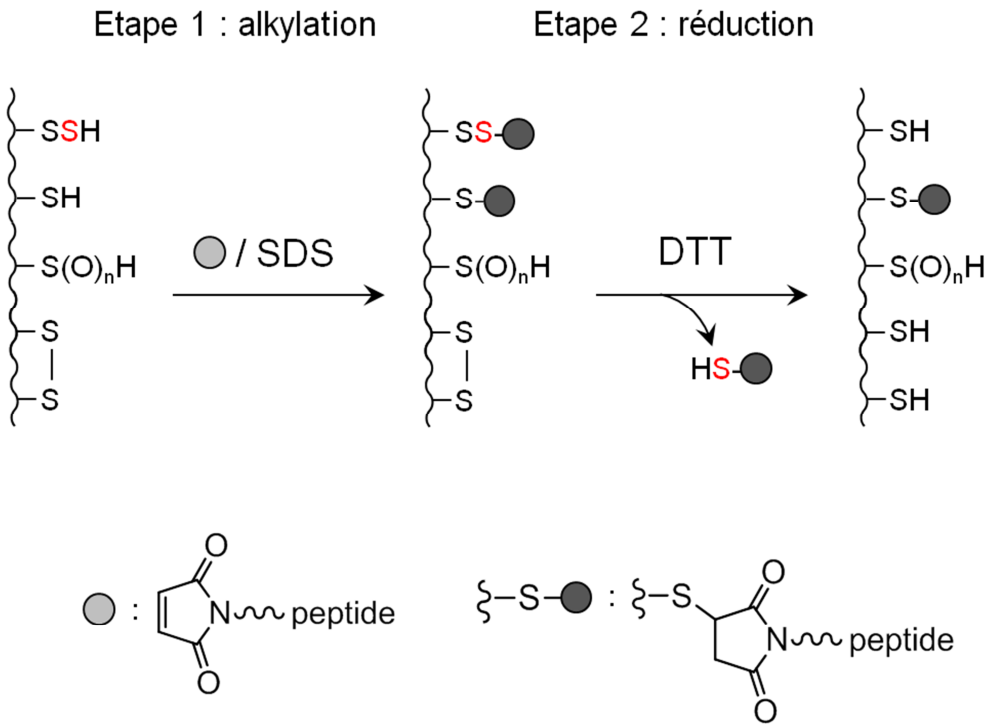
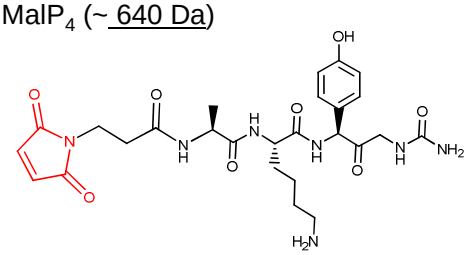


Figure IV. 4. Principe du test de détection des persulfures par alkylation des protéines avec le MalP. Schéma réactionnel du principe d'alkylation des cystéines par un Maléimide-Peptide (MalP), utilisé pour l'identification des persulfures. Les réactions de formation et de réduction des persulfures sont stoppées par l'ajout du MalP en conditions dénaturantes (SDS), pour permettre l'alkylation des groupements thiols dont les cystéines persulfurées et non persulfurées. La présence d'une cystéine persulfurée est révélée par la perte d'une unité Succinimide-Peptide, après la réduction du pont disulfure du persulfure par le DTT.

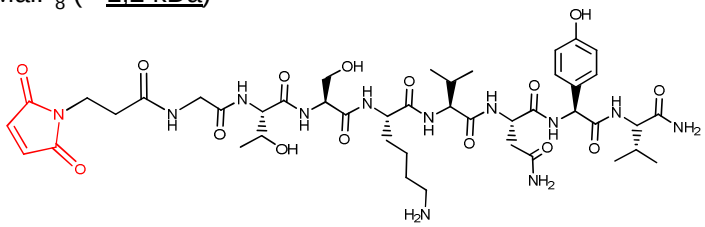
Le test se déroule en deux étapes (**Figure IV. 4**). Au cours de la première étape, les cystéines réduites et les cystéines persulfurées sont alkylées, ce qui permet de distinguer les persulfures des autres modifications des cystéines qui sont non alkylables. Au cours de la deuxième étape, la liaison « -SS- » des persulfures est réduite par le DTT et leur présence est révélée par la perte d'une unité Succinimide (Suc, produit de la réaction entre un maléimide et un thiol), ce qui permet *in fine* de différencier les persulfures et les cystéines réduites.

Nous avons utilisé des maléimides modifiés d'une taille suffisamment grande pour détecter la perte d'une unité succinimide sur un gel d'électrophorèse. Nous avons tout d'abord utilisé un produit commercial, le maléimide-polyéthylène-glycol (Mal-PEG), mais celui-ci n'est pas un produit pur, mais un mélange de polymères d'une taille proche d'une taille définie ; par conséquent les bandes détectées par SDS-PAGE sont très diffuses. Nous avons alors établi une collaboration avec l'équipe d'Anna GRANDAS de l'université de Barcelone qui synthétise des maléimides greffés à des peptides (MalP). Nous avons testé des maléimides de différentes tailles (**Figure IV. 5**). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un maléimide attaché à une chaîne peptidique contenant 16 acides aminés ($MalP_{16}$), d'un poids moléculaire d'environ 2,0 kDa. (**Figure IV. 5**).

$MalP_4$ (~ 640 Da)



$MalP_8$ (~ 1,2 kDa)



$MalP_{16}$ (~ 2,0 kDa)

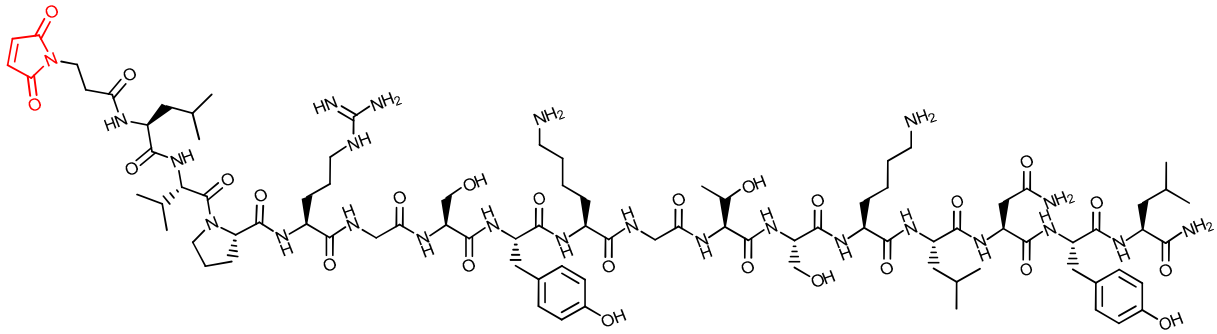


Figure IV. 5. Structures des Maléimides-Peptides testés. La fonction maléimide (en rouge) est rattachée à un peptide contenant 4 ($MalP_4$), 8 ($MalP_8$) ou 16 ($MalP_{16}$) acides aminés.

Nous avons utilisé la protéine NFS1 pour valider le test d'alkylation par le $MalP_{16}$. Nous avons tout d'abord contrôlé que les 7 cystéines de NFS1 sont alkylables, en arrêtant la réaction d'alkylation avant qu'elle ne soit terminée. Le gel SDS-PAGE montre 8 bandes correspondant à la forme non alkylée de la protéine et à l'alkylation progressive des différentes cystéines de NFS1 (**Figure IV. 6**, **A**).

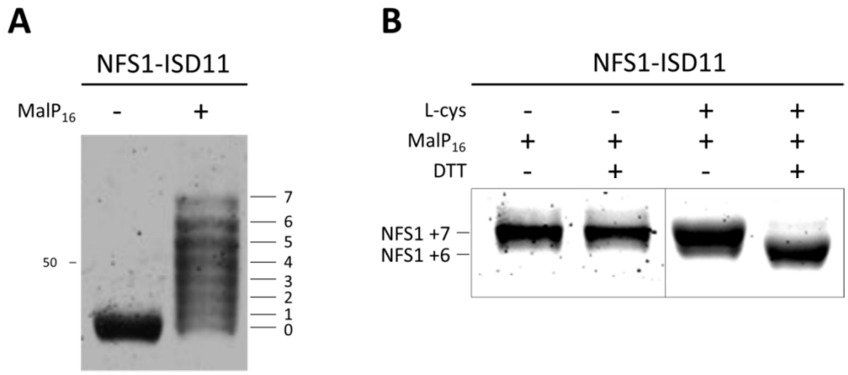


Figure IV. 6. Principe du test d'alkylation avec le $MalP_{16}$. A. L'alkylation de NFS1, qui contient 7 cystéines, présente 8 bandes différentes correspondant aux formes non-alkylée (0), partiellement alkylées (1 à 6) et complètement alkylée (7) de NFS1, après 5 minutes d'incubation avec le $MalP_{16}$ en conditions natives. **B.** Test d'alkylation sur le complexe NFS1-ISD11. En absence de son substrat (L-cystéine), NFS1 est complètement alkylée par le $MalP_{16}$ et aucune perte de $SucP_{16}$ n'est observée après réduction par le DTT. Après réaction avec la L-cystéine, la forme totalement alkylée de NFS1 (NFS1 +7) est convertit en une forme 6 fois alkylée de NFS1 (NFS1 +6) après réduction par le DTT. La perte de ce $SucP_{16}$ indique la présence d'une cystéine persulfurée sur NFS1.

En absence de son substrat (L-cystéine), les sept cystéines de la protéine NFS1 sont alkylées par le $MalP_{16}$ (NFS1 +7) et aucune perte d'un $SucP_{16}$ n'est observée lors de la réduction par le DTT, ce qui montre que les cystéines de NFS1 ne sont ni oxydées ni persulfurées dans la protéine purifiée (**Figure IV. 6**, **B**). Après avoir réagi avec la L-cystéine, les sept cystéines de NFS1 sont toujours alkylées par le $MalP_{16}$ en conditions non réductrices, ce qui indique qu'aucune oxydation des cystéines ne s'est produite ; après la réduction par le DTT, une unité $SucP_{16}$ est perdue dans l'espèce « NFS1 +7 », pour former une espèce « NFS1 +6 », indiquant la présence d'un persulfure sur une des cystéines de NFS1.

Nous avons également constaté que la dénaturation des échantillons par un chauffage à 95°C, avant le dépôt sur un gel SDS-PAGE, provoque des sur-alkylations. Ces bandes correspondent probablement à la réaction entre la fonction maléimide du $MalP_{16}$, présent en léger excès (1,5 équivalents), et une amine primaire (Mather *et al.* 2006), favorisée par le chauffage de l'échantillon. Nous avons donc contrôlé la température au cours des réactions d'alkylation, celle-ci a été fixée à 30°C, et par la suite les échantillons ne seront pas dénaturés par chauffage avant leur dépôt sur gel.

B . 1 . 2 . Utilisation du test d'alkylation au $MalP_{16}$ pour l'étude des cinétiques de formation du persulfure de NFS1

Nous avons utilisé le test d'alkylation par le $MalP_{16}$ pour réaliser des cinétiques de formation de persulfures. La réaction est arrêtée par l'ajout de $MalP_{16}$ (1,5 équivalents par rapport à la quantité totale de thiols), qui va réagir en moins d'une seconde avec la L-cystéine en excès ($k \sim 10^7\ M^{-1}.min^{-1}$, (Bednar 1990)) ; suivi par l'ajout de SDS (~ 2%), pour dénaturer l'échantillon et bloquer toutes les cystéines des protéines en les rendant accessible au $MalP_{16}$. Afin de valider cette méthode nous l'avons comparée avec la technique d'arrêt des réactions par choc acide avec le TCA (non montré). Les cinétiques obtenues dans les deux cas sont très similaires, ce qui confirme que le test d'alkylation des protéines par le $MalP_{16}$ peut être utilisé pour le suivi de cinétiques.

B . 1 . 3 . Effet de la protéine ISCU sur la cinétique de formation du persulfure de NFS1

Nous avons évalué l'effet d'ISCU sur la formation du persulfure de NFS1 en incubant le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) avec un excès de L-cystéine, en présence ou non d'un équivalent de la protéine ISCU. La réaction a été stoppée après 10, 20, 30 et 60 secondes d'incubation (**Figure IV. 7**).

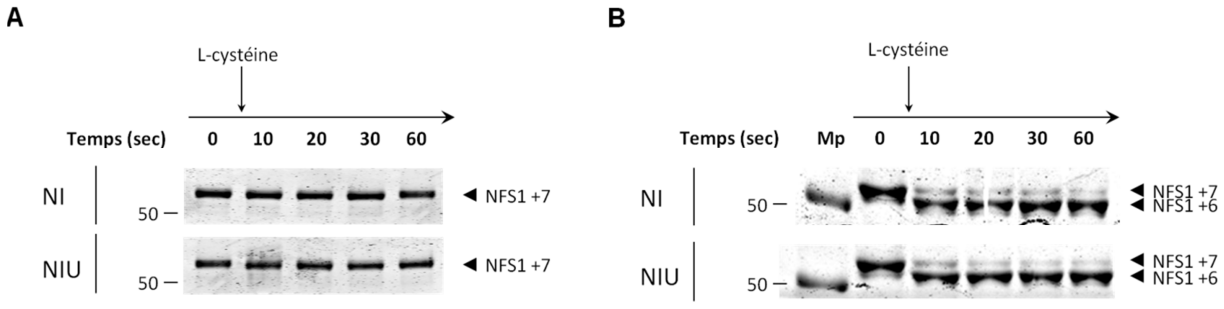


Figure IV. 7. Formation du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU. La cinétique de formation du persulfure sur NFS1 pour les complexes NI et NIU (25 µM) a été réalisée avec 20 équivalents de L-cystéine. **A.** SDS-PAGE 8 % en conditions non réductrices. **B**. SDS-PAGE 8 % en condition réductrices. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Les gels non réduits indiquent que la protéine NFS1 est entièrement alkylée et donc qu'aucune oxydation ne s'est produite au cours de la réaction (**Figure IV. 7**, **A**). L'analyse des gels obtenus en conditions réductrices montre qu'en absence de L-cystéine (t = 0 de la **Figure**

IV. 7, **B**), la protéine NFS1 est entièrement alkylée (NFS1 +7), et qu'une petite quantité de NFS1 est alkylée sur seulement 6 cystéines (NFS1 +6), correspondant à une très faible quantité de forme persulfurée (< 2%). Cette forme persulfurée, présente initialement dans la solution purifiée du complexe NFS1-ISD11, est une quantité résiduelle de NFS1-SSH, non réduit lors du traitement DTT effectué pendant la purification du complexe (Cf. chapitre II). Cette étape a été nécessaire car la protéine NFS1 extraite des bactéries est retrouvée persulfurée à environ 40 %.

En présence de L-cystéine, on remarque qu'après seulement 10 secondes de réaction, la protéine NFS1 est quasiment entièrement persulfurée. Les profils des gels SDS-PAGE obtenus en absence ou en présence de la protéine ISCU sont très similaires, avec une seule cystéine persulfurée et une réaction quasiment terminée après 10 secondes de réaction. Notre système expérimental, où l'arrêt des réactions est réalisé manuellement, ne nous permet pas de descendre en dessous de 10 secondes. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet de la protéine ISCU sur la cinétique de cette réaction. Cependant, ces résultats indiquent qu'ISCU n'est pas nécessaire pour la formation du persulfure de NFS1.

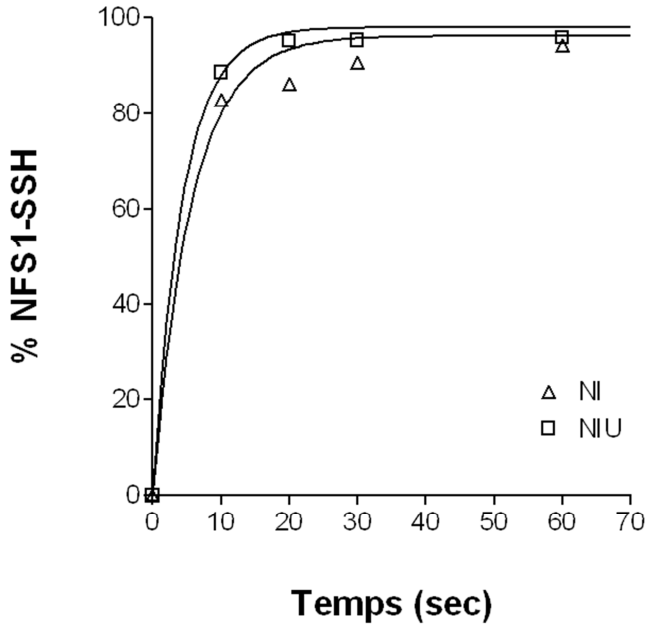


Figure IV. 8. Quantification des gels SDS-PAGE de la Figure IV. 7, B. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(1)**.

Les gels SDS-PAGE obtenus pour les complexes NI et NIU ont été quantifiés avec le scanner Odyssey (Li-cor). Le graphique de la **Figure IV. 8** représente la variation de la quantité de NFS1-SSH en fonction du temps. Chaque point a été obtenu en calculant le

rapport entre NFS1-SSH (NFS1 +6) et la quantité totale de protéines NFS1 (somme de NFS1 +6 et NFS1 +7).

La protéine NFS1 étant une enzyme, nous avons utilisé le modèle développé par Michaelis-Menten pour analyser les cinétiques de nos réactions (Michaelis *et al.* 1913). Nous avons supposé que la formation du complexe « enzyme-substrat » (« NFS1-(L-Cys) ») est très rapide devant la réaction de conversion de ce complexe en produit, qui correspond à la forme persulfurée de NFS1. Ainsi, la formation du persulfure sur NFS1 peut être considérer comme une réaction intramoléculaire qui peut être décrite par l'équation **(1)** :

$$[\mathbf{NFS1\text{-}SSH}] = \mathbf{A} \cdot \left(\mathbf{1} - \exp^{(-k_F \cdot t)} \right)$$

Où A représente la quantité totale de NFS1-SSH formés au cours de la réaction, k_F est la constante de formation du persulfure sur NFS1 et t, le temps. Etant donné que la cinétique ne peut pas être résolue en dessous de 10 secondes, nous avons déterminé les valeurs minimales des constantes de formation du persulfure de NFS1, k_F. Nous avons obtenu des valeurs de l'ordre de 0,25 s^{-1} pour les complexes NI et NIU (Cf. **Tableau IV. 3**).

Ainsi, nous avons démontré d'une part, qu'en présence de L-cystéine, NFS1 est majoritairement sous une forme persulfurée en quelques secondes ; et que la formation de ce persulfure ne semble pas dépendre de la présence de la protéine ISCU. D'autre part, le test d'alkylation par le $MalP_{16}$ nous montre qu'une seule cystéine de la protéine NFS1 est persulfurée au cours du cycle catalytique, correspondant probablement à la cystéine catalytique de NSF1. Cependant, ce test ne nous permet pas de savoir si la cystéine persulfurée est mono-persulfurée (-SSH) ou poly-persulfurée ($-S(S)_nH$). Pour répondre à cette question, nous avons analysé les protéines entières par spectrométrie de masse.

B . 2 . Etude de la formation du persulfure de NFS1 par spectrométrie de masse en protéine entière

Le complexe NFS1-ISD11 (40µM), en présence ou en absence d'un équivalent d'ISCU, a été incubé avec un excès de L-cystéine. Le mélange a ensuite été analysé par spectrométrie de masse ESI-Q/TOF (David Cornu, Plateforme IMAGIF). La **Figure IV. 9** (**A**) présente le spectre correspondant au complexe NI en absence de L-cystéine. Nous constatons

la présence de deux pics, avec des masses de 46 322 ± 2 uma et de 46 500 ± 2 uma, correspondant à NFS1 et à sa forme gluconoylée notée NFS1* (Cf. Chapitre III).

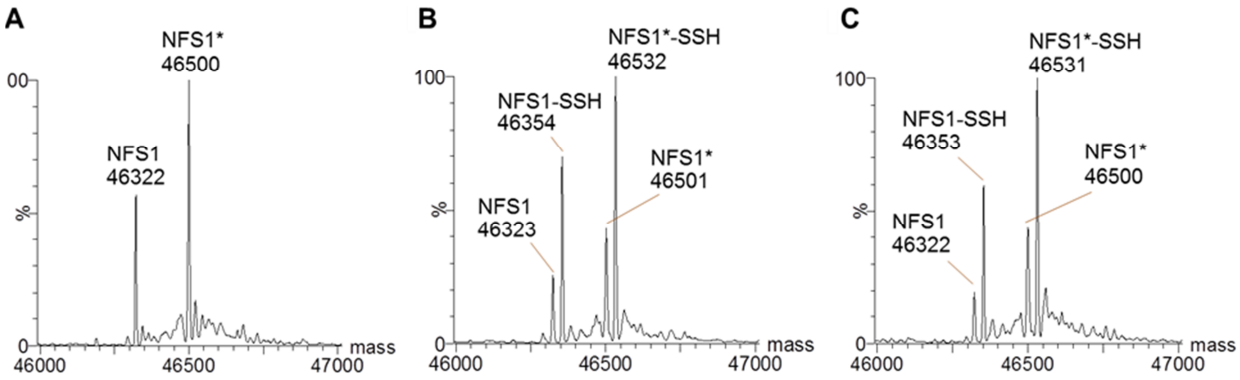


Figure IV. 9. Spectres de masse ESI-Q/TOF des complexes NI et NIU. A. Spectre de masse reconstitué du complexe NI en absence de L-cystéine. **B.** Spectres de masse reconstitués du complexe NI (40 µM) et **C.** du complexe NIU (40 µM) après 3 minutes de réaction en présence de 10 équivalents de L-cystéine.

Sans L-cystéine, aucune forme persulfurée de NFS1 n'est détectée par spectrométrie de masse en protéine entière. En présence de L-cystéine, nous remarquons que les spectres des complexes NI et NIU comportent quatre espèces (**Figure IV. 9**, **B** et **C**). Nous retrouvons les protéines NFS1 et NFS1*, à 46 323 ± 2 uma et 46 501 ± 2 uma, respectivement ; et deux autres espèces à 46 354 ± 2 uma et 46 532 ± 2 uma, correspondant à NFS1 et NFS1* avec un gain de masse de 32 Da. Cette masse est compatible avec un atome de soufre ou deux atomes d'oxygène supplémentaires, sous la forme d'un acide sulfinique (-SO_2H) ou bien de deux acides sulféniques (-SOH). Pour distinguer ses deux possibilités, nous avons analysé, sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL, une digestion tryptique de la protéine NFS1. Les résultats indiquent qu'un unique peptide « DVALSSGSA**C**TSASLEPSYVLR », contenant la cystéine catalytique de NFS1, est modifié par un gain de masse de 32 Da par rapport à la masse attendue du peptide (**Tableau IV. 1**, Cam *vs* S-Cam, Cf. **Annexe 15**). La différence de masse entre les deux peptides détectés est de 31,971 Da. Cette masse est en accord avec la présence d'un soufre supplémentaire sur le peptide (31,97211 Da) ; et réfute donc la présence de deux oxygènes (31,9898 Da). L'ensemble de ces résultats confirme que le gain de masse de 32 Da observé correspond à la présence d'un persulfure sur NFS1 et NFS1*.

Position	Cystéine	**Masses attendues**			**NIUF** avec **L-cystéine**	
		Cam	**S-Cam**	**(O_2)-Cam**	**Cam**	**S-Cam**
74-95	C383	2270,09686	2302,06897	2302,08666	2270,09917	2302,07012

Tableau IV. 1. Résumé des résultats obtenus après analyse de la digestion tryptique de NFS1 par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL. Le peptide « DVALSSGSACTSASLEPSYVLR », contenant la cystéine C383 catalytique de NFS1 (numérotation du précurseur de NFS1) est retrouvé persulfuré à près de 50 %.

Ainsi, grâce à la spectrométrie de masse, nous avons déterminé que la cystéine persulfurée de NFS1, observée lors de l'alkylation au $MalP_{16}$ (**Figure IV. 7**), est mono-persulfurée. Cependant, cette analyse révèle également la présence d'une certaine quantité de forme non persulfurée de NFS1, contrairement à ce que nous avions observé avec le test d'alkylation au maléimide-peptide (quantité de persulfure > 99 %). Etant donné que la modification apportée par un persulfure n'induit pas d'important changement de masse (seulement 0,07 % de la masse de NFS1), il est généralement accepté que de telles modifications ne modifient pas les propriétés d'ionisation de la protéine. Dans ce cas, on peut réaliser une analyse quantitative, en comparant les intensités des pics. En faisant cette approximation, nous avons obtenu 20 % à 30 % de forme non persulfurée de NFS1. Ces différences suggèrent soit que le test d'alkylation surestime la quantité de protéine persulfurée, soit que le persulfure de NFS1 est perdu en raison des conditions d'analyse par spectrométrie de masse.

Plusieurs raisons pourraient expliquer la perte du persulfure de NFS1 dans les échantillons analysés par spectrométrie de masse. Tout d'abord, il est possible que la L-cystéine ne soit pas totalement éliminée au cours du désalage. Hors, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, la L-cystéine est capable de réduire le persulfure de NFS1. Cependant, en conditions non-dénaturantes et après désalage sur micro-Biospin, nous avons constaté avec le test d'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$, que le persulfure de NFS1 est stable pendant près d'une heure à un de pH 8 (non montré). L'hypothèse la plus probable est que le persulfure de NFS1 est instable dans les conditions d'analyse de spectrométrie de masse. Cette hypothèse a également été mise en avant dans une étude sur de petites molécules persulfurées telles que le GSSH (glutathion persulfurée) (Pan *et al.* 2013). Etant donné que le persulfure de NFS1 est stable pendant près d'une heure à un de pH 8 (non montré), la perte du persulfure ne se produirait donc pas dans les conditions non-dénaturantes de préparation de l'échantillon (désalage et échange avec un tampon NH_4OAc 50 mM, pH 7) ; mais au cours

des étapes suivantes, où les échantillons sont dénaturés dans un mélange acétonitrile:eau 50:50, contenant 1% d'acide formique. Les fonctions thiols des cystéines et des persulfures n'étant pas protégées, contrairement au test d'alkylation ; des réactions intramoléculaires de réduction par l'un des thiols libres de la protéine NFS1 sont possibles, conduisant à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Ce type de modification (- 2 uma) ne serait pas détectable dans nos spectres de masse en protéine entière étant donné la résolution de ± 2 uma. Cependant, les conditions acides ne favorisent pas les échanges thiol/disulfure. Une hypothèse alternative serait une perte de persulfure au moment de l'ionisation ou de l'accélération des ions qui sont deux étapes apportant une grande quantité d'énergie susceptible de favoriser la rupture de certaines liaisons ; mais, dans nos conditions, cet évènement est peu probable. Enfin, comme nous allons le voir dans la section suivante, nous n'avons pas observé de telles différences entre le test d'alkylation et la spectrométrie de masse concernant le persulfure d'ISCU, ce qui nous indiquerait que le phénomène est protéine-dépendant.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'analyse de la formation du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU indique que NFS1 est mono-persulfurée sur une unique cystéine ; et que la protéine ISCU n'est pas requise pour la formation de ce persulfure. Nous avons ensuite étudié le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU qui a été décrit avec les protéines procaryotes IscS et IscU.

C . Etude du transfert de soufre de NFS1 vers ISCU

Un transfert de soufre a été observé entre les protéines IscS et IscU du système ISC bactérien (Urbina *et al.* 2001; Smith *et al.* 2005) ainsi qu'entre les protéines SufS, SufE et SufB du système SUF (Layer *et al.* 2007). Chez les eucaryotes, aucun transfert de ce genre n'a encore été mis en évidence entre NFS1 et ISCU ; et le rôle de ce transfert de soufre dans la biogenèse des centres Fe/S bactérien est mal connu. Il a été proposé qu'après réduction, le persulfure d'IscU soit incorporé dans le centre Fe/S synthétisé (Smith *et al.* 2001). Nous avons donc essayé de visualiser un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par spectrométrie de masse et par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$. Un complexe covalent par pont disulfure intermoléculaire entre IscS et IscU a également été observé (Kato *et al.* 2002). Il a

été proposé que ce complexe provienne de la formation d'ions sulfures par réduction du persulfure d'IscS par IscU. Bien que ces données soient controversées, nous avons cherché à déterminer si un tel complexe pouvait également se former entre ISCU et NFS1.

C . 1 . Etude du transfert de soufre par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

C . 1 . 1 . Analyse de la protéine ISCU par alkylation avec le $MalP_{16}$

Dans un premier temps, nous avons contrôlé que les 4 cystéines d'ISCU étaient alkylables par le $MalP_{16}$ et qu'aucune autre espèce ne pouvait se former. En incubant la protéine ISCU avec une quantité sous-stœchiométrique de $MalP_{16}$, nous avons obtenu cinq bandes sur gel SDS-PAGE correspondants aux formes non alkylée (0), partiellement alkylées (1 à 3) et complètement alkylée (4) de la protéine ISCU (**Figure IV. 10**). Ainsi, les 4 cystéines d'ISCU sont alkylables par le $MalP_{16}$.

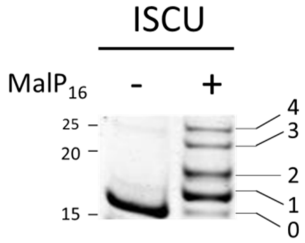


Figure IV. 10. Principe d'alkylation de la protéine ISCU par le $MalP_{16}$. L'alkylation d'ISCU, qui contient 4 cystéines, présente 5 bandes différentes correspondant aux formes non-alkylée (0), partiellement alkylées (1 à 3) et complètement alkylée (4) d'ISCU. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

C . 1 . 2 . Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

Nous avons ensuite utilisé le test d'alkylation pour détecter la formation d'un persulfure sur la protéine ISCU. Le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) a été incubé avec un excès de L-cystéine, en présence d'un équivalent d'ISCU et la réaction a été stoppée aux temps indiqués dans la **Figure IV. 11**.

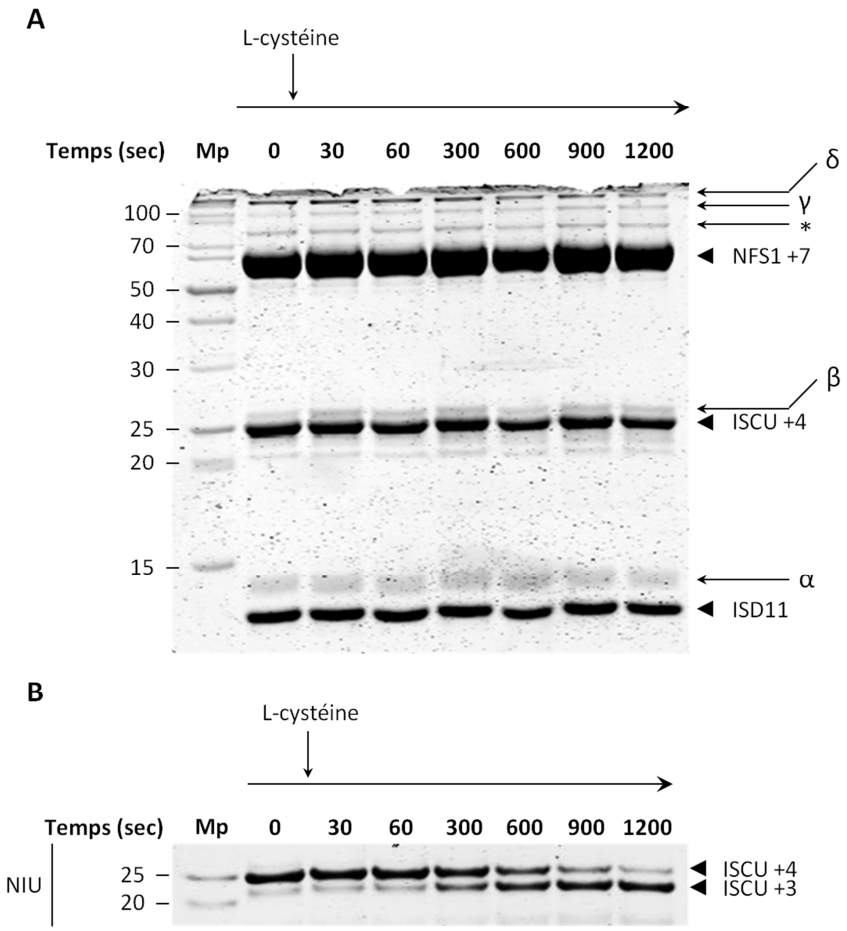


Figure IV. 11. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$. La cinétique de formation du persulfure sur la protéine ISCU du complexe NIU (25 µM) a été réalisée avec 20 équivalents de L-cystéine. **A.** SDS-PAGE 14 % (entier) en conditions non réductrices. **B.** Gel SDS-PAGE 14 % en conditions réductrices. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Le gel non réduit montre trois bandes majoritaires, correspondants aux protéines NFS1 et ISCU entièrement alkylées (NFS1 +7 et ISCU +4) et à ISD11; ainsi que plusieurs bandes de faibles intensités (**Figure IV. 11**, **A**). La bande α, en bas du gel, correspond probablement à une petite quantité de la protéine ISD11 alkylée par un $MalP_{16}$ sur un résidu autre qu'une cystéine ; car ISD11 ne possède aucune cystéine dans sa séquence. La bande β représente une faible proportion de la protéine ISCU sur-alkylée (ISCU +5) ; même si les sur-alkylations sont limitées par un chauffage modéré lors de la réaction d'alkylation, il est impossible d'exclure entièrement cette réaction parasite. Pour finir, le symbole * représente l'impureté présente dans la solution du complexe NFS1-ISD11 purifié ; et les bandes γ et δ semblent correspondre à d'autres impuretés du complexe NFS1-ISD11 plutôt qu'à un complexe covalent entre NFS1 et ISCU alkylées (~ 80 kDa), car ces bandes ont un poids moléculaire supérieur à 100 kDa et sont toujours présentes après la réduction des échantillons par le DTT. Ainsi, l'analyse du gel

non réduit indique qu'aucun complexe covalent par pont disulfure intermoléculaire ne se forme entre ISCU et NFS1 et qu'aucune cystéine d'ISCU n'est oxydée.

L'analyse du gel SDS-PAGE en conditions réductrices montre qu'en absence de L-cystéine (t = 0, **Figure IV. 11**, **B**), la protéine ISCU est entièrement alkylée (ISCU +4). Nous distinguons également une petite quantité de protéine ISCU alkylée sur seulement 3 cystéines (ISCU +3), correspondant à une forme persulfurée d'ISCU. Nous avons observé qu'entre 30 % et 50 % de la protéine ISCU est obtenue sous une forme persulfurée à la fin de la purification. C'est la raison pour laquelle nous avons ajouté une étape de réduction de la protéine par le DTT avant la chromatographie d'exclusion stérique finale (Cf. Chapitre II). Cette quantité résiduelle de forme persulfurée d'ISCU, observée par alkylation avec le $MalP_{16}$, pourrait donc être due à une réduction incomplète de la protéine par le DTT ; mais il est également possible que la quantité résiduelle de persulfure sur NFS1, discutée plus haut, soit transférée à ISCU (Cf. **Figure IV. 7**). Après quelques minutes de réaction avec la L-cystéine, le gel révèle l'apparition d'une forme d'ISCU alkylée sur seulement 3 cystéines (ISCU +3), correspondant à la formation d'un persulfure sur l'une des 4 cystéines d'ISCU (**Figure IV. 11**, **B**). La réaction est quasi-complète après 20 minutes. Le gel SDS-PAGE a ensuite été quantifié, et la cinétique obtenue est présentée dans la **Figure IV. 12**.

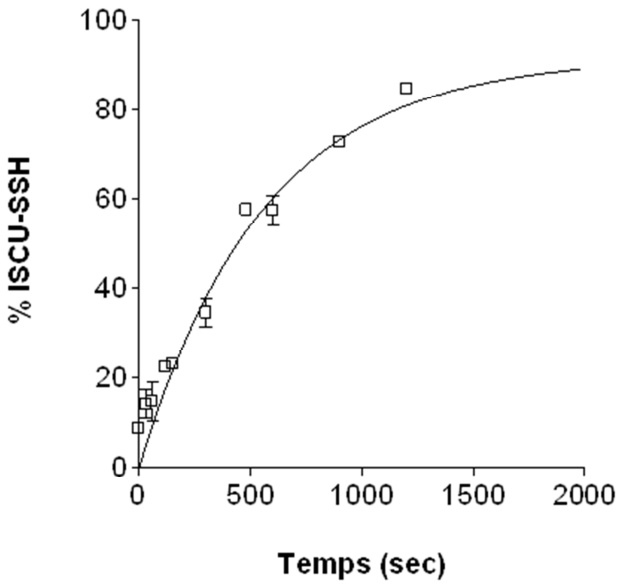


Figure IV. 12. Quantification des gels SDS-PAGE de la Figure IV. 11, B. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(2)**.

Pour analyser la cinétique de la réaction nous avons considéré le transfert comme une réaction unimoléculaire au sein du complexe NIU. Sur la base de ce mécanisme, la formation du persulfure d'ISCU peut être décrite par l'équation **(2)** :

$$[\text{ISCU-SSH}] = A \cdot (1 - \exp^{(-k_T \cdot t)})$$

Où A représente la quantité totale de ISCU-SSH formé au cours de la réaction, k_T est la constante de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU et t, le temps. Nous avons déterminé une valeur de 0,0018 ± 0,0004 s^{-1} pour la constante de transfert, k_T, du complexe NIU (**Figure IV. 12**).

C . 1 . 3 . Mécanisme de transfert

Ces résultats soulèvent la question du mécanisme par lequel le soufre est transféré entre NFS1 et ISCU. Trois hypothèses sont possibles ; soit un transfert direct entre la cystéine persulfurée de NFS1 et l'une des cystéines d'ISCU, soit l'une des cystéines d'ISCU est capable de réaliser une attaque nucléophile sur l'intermédiaire PLP ayant fixé et « activé » la L-cystéine ; soit le transfert est indirect *via* une molécule intermédiaire, comme la L-cystéine, qui est persulfuré au cours de la réaction de réduction du persulfure de NFS1, comme nous le verrons plus loin (Cf. **Figure IV. 1**).

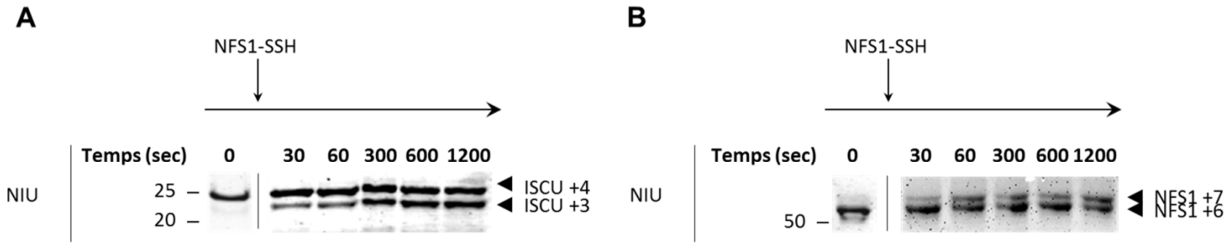


Figure IV. 13. Mise en évidence d'un transfert de soufre direct entre NFS1 et ISCU. Cinétique de formation du persulfure sur ISCU (**A**) corrélée à la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 (**B**). L'expérience de transfert de soufre a été réalisée sans cystéine, après l'ajout d'un équivalent de NFS1-SSH. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

Nous avons donc réalisé une expérience de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, en absence de L-cystéine. Pour cela, le complexe NFS1-ISD11 a tout d'abord été incubé avec de la L-cystéine. L'excès de L-cystéine est éliminé et la réaction de transfert est initiée avec l'ajout d'ISCU. Les résultats nous montrent que la formation du persulfure sur ISCU est directement corrélée avec la réduction du persulfure de NFS1 (**Figure IV. 13**). Cette

expérience confirme que le transfert de soufre est direct, car il ne nécessite pas d'intermédiaire et qu'il est réalisé entre la cystéine persulfurée de NFS1 et l'une des cystéines d'ISCU.

Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'un transfert de soufre entre NFS1 et une cystéine d'ISCU. Nous avons également démontré que ce transfert est direct entre les deux protéines avec l'attaque nucléophile d'une des cystéines d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure de NFS1, pour former un persulfure sur la protéine ISCU. Afin de déterminer, comme pour NFS1, si la cystéine d'ISCU est mono- ou poly-persulfurée, nous avons étudié la structure de ces persulfures par spectrométrie de masse.

C . 2 . Analyse du transfert de soufre par spectrométrie de masse en protéine entière

Le complexe NFS1-ISD11 (40 µM) a été incubé avec un excès de L-cystéine et après 3 minutes de réaction, l'échantillon a été désalé, pour éliminer la L-cystéine en excès avant l'analyse par spectrométrie de masse en protéine entière (ESI-Q/TOF).

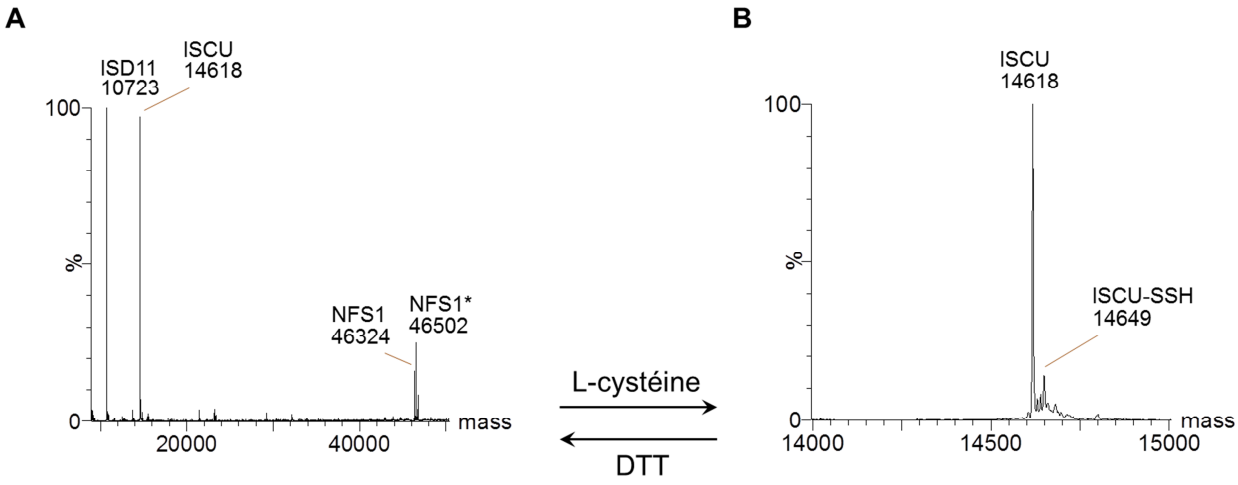


Figure IV. 14. Analyse du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU par spectrométrie de masse en protéine entière. Spectres de masse ESI-Q/TOF reconstitués du complexe NIU en absence (**A**) et en présence (**B**) de 10 équivalents de L-cystéine (zoom sur la zone 14 000 à 15 000 uma).

En absence de L-cystéine, le spectre du complexe NIU de la **Figure IV. 14** (**A**) présente quatre pics à 10 723 ± 2 uma, 14 618 ± 2 uma, 46 324 ± 2 uma et 46 502 ± 2 uma correspondant respectivement aux protéines ISD11 (masse attendue, 10 723,3 Da), ISCU

(masse attendue, 14 617,8 Da pour $ISCU_{36-168}$), NFS1 et sa forme gluconoylée, NFS1* (**Figure IV. 14**, **A**). Aucune forme persulfurée de la protéine ISCU n'est détectée dans ces conditions. Après réaction avec la L-cystéine, le spectre montre la présence d'un pic majoritaire à 14 618 ± 2 uma correspondant à ISCU et d'un pic minoritaire à 14 649 ± 2 uma, avec un gain de masse de 32 Da par rapport à la masse initiale de la protéine ISCU, attribué à une forme persulfurée d'ISCU (**Figure IV. 14**, **B**).

Ces résultats démontrent que le transfert de soufre conduit à une forme mono-persulfurée d'ISCU. Ces résultats posent la question de l'identité de la cystéine d'ISCU portant le persulfure transféré depuis NFS1. Pour répondre à cette question, nous avons analysé une carte peptidique des protéines NFS1, ISD11 et ISCU par LTQ-Orbitrap XL.

D . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU

Pour identifier la cystéine d'ISCU portant le persulfure, le mélange protéique contenant NFS1-ISD11 (20 µM) et un équivalent d'ISCU a été analysé avant et après réaction avec de la L-cystéine, et les groupements thiols et les persulfures ont été alkylés avec de l'iodoacétamide pour les protéger. Les protéines ont ensuite été digérées par la trypsine ; et les peptides obtenus ont été analysés sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL par Jean-Pierre Le Caer de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette).

D . 1 . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU par LTQ-Orbitrap XL

La protéine ISCU contient quatre résidus cystéines, dont trois cystéines conservées, C35, C61 et C104 et une cystéine non-conservée, C96 (numérotation de la forme mature d'ISCU murin, **Figure IV. 15**). Nous avons choisi la trypsine pour générer des peptides, car la carte peptidique d'ISCU montre que ces quatre cystéines sont attendues dans quatre peptides différents après une digestion tryptique.

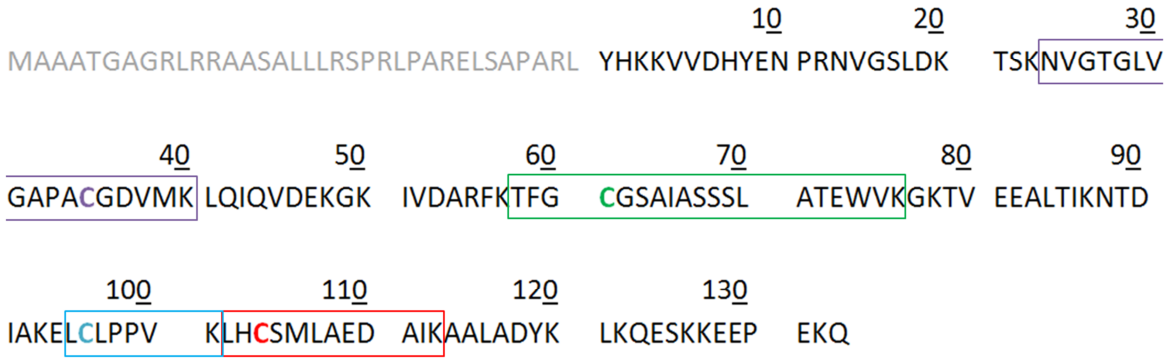


Figure IV. 15. Séquence de la protéine ISCU de souris. La séquence est numérotée à partir de la forme mature de la protéine ISCU, avec la séquence d'adressage à la mitochondrie en gris. Les quatre cystéines d'ISCU sont en gras et les séquences des peptides détectés par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap, contenant ces cystéines, sont encadrées par différentes couleurs.

Le **Tableau IV. 2** résume les masses attendues pour les peptides d'ISCU contenant soit une cystéine soit un persulfure alkylées par l'iodoacétamide (Cam et S-Cam).

Cystéine	**Masses attendues**			**NIU** sans L-cystéine		**NIU** avec **L-cystéine**	
	Cam	**S-Cam**	**(O_2)-Cam**	**Cam**	**S-Cam**	**Cam**	**S-Cam**
C35	1645,80356	1677,77567	1677,79336	1645,80217	ND	1645,80351	1677,77593
C61	1971,94796	2003,92007	2003,93776	1971,95195	ND	1971,95195	ND
C96	955,52806	987,50017	987,51786	955,52837	ND	955,52867	ND
C104	1387,67076	1419,64287	1419,66056	1387,67021	1419,64263	1387,67143	1419,64287

Tableau IV. 2. Résumé des résultats obtenus après analyse des peptides des protéines NFS1, ISD11 et ISCU sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL. En absence de L-cystéine, la cystéine C104 est persulfurée à 1 % ; alors qu'en présence de L-cystéine, les cystéines C35 et C104 sont persulfurées à 5 % et 65 %.

En absence de L-cystéine, les quatre peptides sont détectés avec leurs cystéines carbamidométhylées (Cam). Le peptide « LHCSMLAEDAIK », contenant la cystéine C104, est également détecté avec une cystéine persulfurée et carbamidométhylée. Il semble donc qu'environ 1 % de la protéine ISCU soit initialement persulfurée sur la cystéine C104. Cette cystéine pourrait donc être la cystéine persulfurée correspondant à la quantité résiduelle d'ISCU persulfurée, observée lors des expériences d'alkylation des protéines par le $MalP_{16}$ (**Figure IV. 11**, **B**).

En présence de L-cystéine, les quatre peptides d'ISCU carbamidométhylés sont toujours détectés. Nous remarquons également que deux masses correspondant à des peptides persulfurés et carbamidométhylés sont détectés. Nous retrouvons la cystéine C104 d'ISCU

ainsi que la cystéine C35, dont les identités ont été vérifiées par MS-MS (Cf. **Annexes 16** à **17**). Nous nous sommes alors intéressés aux intensités des quatre peptides, persulfurés ou non, obtenus pour le complexe NIU en présence de L-cystéine. La quantification de ces peptides indique que la cystéine C104 est persulfurée à 65 % et seulement à 5 % pour la cystéine C35. L'ensemble de ces informations suggère que la cystéine C104 est la cystéine majoritairement persulfurée. Notre hypothèse est renforcée par le fait que cette cystéine C104 persulfurée est initialement présente dans le complexe NIU. Pour le vérifier, nous avons produit les mutants C35S, C61S et C104S d'ISCU, où les trois cystéines conservées ont été remplacées par un résidu sérine. Nous avons choisi de ne pas étudier la mutant de la cystéine C96 d'ISCU, car elle ne fait pas partie des cystéines conservées de la protéine.

D . 2 . Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU avec les mutants C35S, C61S et C104S d'ISCU

Nous avons utilisé le test d'alkylation par le $MalP_{16}$ pour déterminer si les mutants C35S, C61S et C104S d'ISCU se persulfurent. Sachant que le mutant C61S d'ISCU ne forme aucun complexe avec NFS1-ISD11, seuls les mutants C35S et C104S ont pu être étudiés (Cf. Chapitre III). Le complexe NFS1-ISD11 a été incubé en présence d'un équivalent du mutant C35S ou C104S d'ISCU. La réaction a été initiée avec un excès de L-cystéine et stoppée au temps indiqués dans la **Figure IV. 16** et la **Figure IV. 17**.

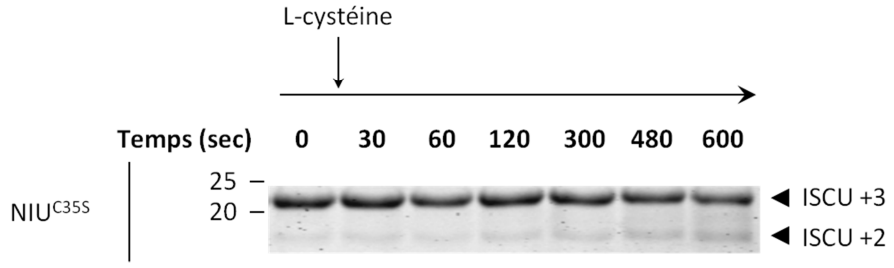


Figure IV. 16. Cinétique de formation du persulfure d'ISCU^{C35S}. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de formation du persulfure sur le mutant C35S d'ISCU du complexe NIU^{C35S} (25 µM), avec 20 équivalents de L-cystéine. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

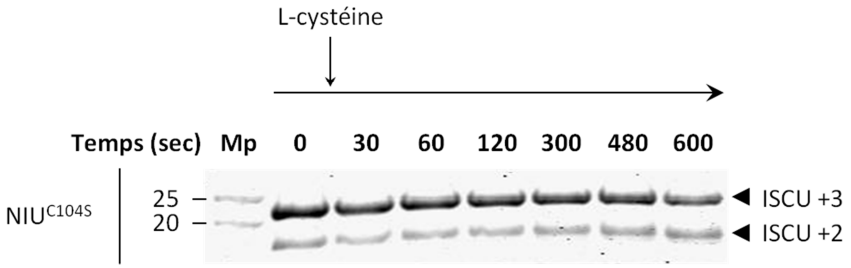


Figure IV. 17. Cinétique de formation du persulfure d'ISCU^{C104S}. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de formation du persulfure sur le mutant C104S d'ISCU du complexe NIU^{C104S} (25 µM), avec 20 équivalents de L-cystéine. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa.

En absence de L-cystéine (t = 0, **Figure IV. 16** et **Figure IV. 17**), les résultats montrent qu'une petite quantité de persulfure est présente sur les protéines ISCU^{C35S} et ISCU^{C104S}, indiquant la présence d'un persulfure en petite quantité sur une des trois cystéines restantes de ces mutants. En présence de L-cystéine, nous remarquons que le rapport entre la forme réduite et la forme persulfurée des mutants C35S et C104S d'ISCU ne varie pas, ou très peu, après 10 minutes d'incubation avec un excès de L-cystéine. Ce résultat indique que la mutation des cystéines d'ISCU en position 35 et 104 par une sérine bloque le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, suggérant que les cystéines C35 et C104 d'ISCU sont indispensables au bon fonctionnement du complexe ternaire.

L'ensemble des résultats montre que le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU est direct et qu'il cible plusieurs cystéines différentes dans ISCU. Ce résultat est surprenant, car une seule cystéine persulfurée est détectée avec le test d'alkylation et par spectrométrie de masse, suggérant que la forme mono-persulfurée d'ISCU correspond à un mélange de protéines ISCU persulfurées sur une seule cystéine, mais avec une cystéine différente dans chaque espèce. Cependant, la quantification des peptides indique que la cysteine C104 est la cystéine majoritairement persulfurée, sur laquelle s'accumule un persulfure, ce qui laisse supposer que l'espèce observée avec le test d'alkylation et par spectrométrie de masse correspond à une forme où la cystéine C104 d'ISCU est persulfurée. L'analyse des mutants C35S et C104S d'ISCU, pour déterminer la cible primaire de la réaction de transfert, c'est-à-dire, la cystéine d'ISCU qui réalise une attaque nucléophile sur le persulfure de NFS1, montre que les cystéines C35 et C104 sont toutes les deux importantes pour le transfert. Nous ne pouvons donc pas conclure qu'en a l'identité de la cible primaire du transfert de soufre. Il serait possible, par exemple que la cible primaire soit la cystéine C35 et que le persulfure de la cystéine C35 soit ensuite transféré sur la cystéine C104.

La présence d'un persulfure sur la protéine ISCU soulève maintenant la question supplémentaire de sa contribution dans l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU en cycle multiple. L'étude des vitesses de réduction des persulfures d'ISCU et de NFS1 devrait nous permettre de déterminer lequel des deux persulfures contribue à l'activité cystéine désulfurase globale ou si les deux persulfures contribuent simultanément.

E . Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU

Nous avons de nouveau utilisé le test d'alkylation des cystéines par le $MalP_{16}$, pour étudier la réaction de réduction du persulfure de NFS1 séparément de la réaction de formation de NFS1-SSH. Pour ce faire, le complexe NFS1-IDS11, avec ou sans un équivalent d'ISCU, a été incubé en présence de L-cystéine, afin de former le persulfure sur la protéine NFS1. La L-cystéine en excès est ensuite éliminée par à un échange de tampon. Cette étape est nécessaire avant l'ajout du DTT pour éviter que le persulfure de NFS1, réduit par le DTT, soit de nouveau formé. La réaction de réduction est initiée par l'addition du DTT au mélange réactionnel et est stoppée aux temps indiqués dans la **Figure IV. 18**.

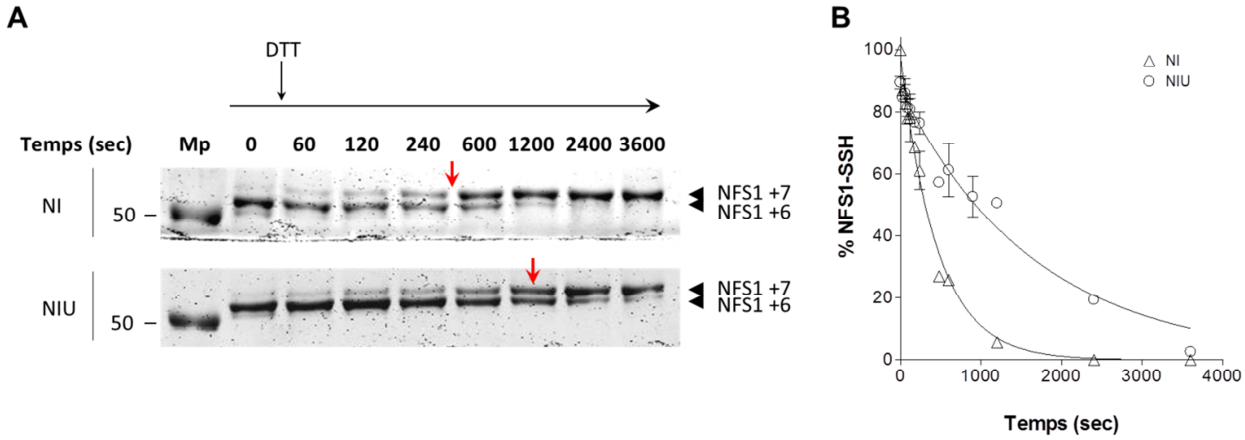


Figure IV. 18. Réduction du persulfure de NFS1 dans les complexes NI et NIU. A. SDS-PAGE 8 % de la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 par 50 équivalents de DTT pour les complexes NI et NIU (25 µM). La réaction est stoppée avec le $MalP_{16}$ au temps indiqués. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(3)**.

Les résultats montrent qu'en absence de DTT (t =0, **Figure IV. 18**, **A**), la forme majoritaire observée est la forme NFS1-SSH (NFS1 +6), indiquant que le persulfure de NFS1 est stable dans ces conditions. Nous remarquons ensuite qu'après 2 minutes de réaction en

présence de DTT (t = 120 sec), la forme non persulfurée de NFS1 apparait (bande du haut, notée NFS1+7), ce qui caractérise la réduction de NFS1-SSH par le DTT. Les flèches rouges de la **Figure IV. 18** (**A**) indiquent approximativement le temps pour lequel environ 50 % de la forme NFS1-SSH a été réduite. Nous constatons ainsi que la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 du complexe NI est plus rapide que celle du complexe NIU, ce qui montre que la protéine ISCU a un effet ralentisseur sur la vitesse de réduction du persulfure de NFS1. Nous avons ensuite quantifié les gels SDS-PAGE obtenus pour les complexes NI et NIU. La réduction du persulfure de NFS1 peut être considérer comme une réaction bimoléculaire (Cf. Partie G. 2). De plus, nous avons ajouté le DTT en excès (50 équivalents) par rapport à la concentration de protéines, ce qui implique que la concentration initiale en DTT varie très peu. Il y a alors dégénérescence de l'ordre de la réaction, et la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 peut être décrite par l'équation **(3)**:

$$[\mathbf{NFS1\text{-}SSH}] = \mathbf{A} \cdot \exp^{(-k_{R1} \cdot [DTT]_0 \cdot t)}$$

Où A correspond à la quantité totale de NFS1-SSH formés au cours de la réaction, k_{R1} est la constante de vitesse de réduction du persulfure de NFS1 par le DTT, $[DTT]_0$, la concentration initiale en DTT et t, le temps. Nous avons obtenu le graphique présenté en **Figure IV. 18** (**B**) et avons déterminé des constantes de vitesse de réduction de NFS1-SSH par le DTT, k_{R1}, de 2,0 ± 0,1 $M^{-1}.s^{-1}$ pour le complexe NI et 0,55 ± 0,05 $M^{-1}.s^{-1}$ pour NIU.

Les expériences d'alkylation par le $MalP_{16}$ nous ont permis d'analyser la réaction de réduction du persulfure de NFS1 indépendamment de la réaction de formation de NFS1-SSH. Nous avons constaté que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 dans le complexe NI est environ 4 fois plus lente en présence de la protéine ISCU. Ce facteur 4 est proche du facteur 3 que nous avions observé en cycle multiple, lors du dosage de l'alanine générée par les complexes NI et NIU (Cf. **Figure IV. 2**). En cycle multiple, les réactions de formation et de réduction du persulfure de NFS1 se produisent toutes les deux (l'une après l'autre) ; mais la vitesse globale du système est déterminée par la réaction la plus lente des deux, appelée réaction cinétiquement limitante ou déterminante. Les résultats en cycle unique, obtenus ici par le test d'alkylation, montrent que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 est plus lente que sa formation, ce qui suggère que la réduction est l'étape limitante du cycle catalytique de l'enzyme. Ce résultat permet donc d'expliquer l'effet d'atténuation d'ISCU sur l'activité cystéine désulfurase de NFS1 ; car la réaction cinétiquement limitante est la réduction et qu'ISCU ralentit la vitesse de réduction du persulfure de NFS1. Cependant, le

transfert de soufre vers ISCU et la réduction du persulfure formé sur cette protéine pourraient également participer au cycle catalytique de l'enzyme quand ISCU est présente. Nous avons donc étudié la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU dans les mêmes conditions que pour NFS1.

F . Etude de la réduction du persulfure d'ISCU par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$

Afin d'étudier la réduction du persulfure d'ISCU, le complexe NFS1-ISD11 a été incubé pendant 25 minutes en présence d'un équivalent d'ISCU et de L-cystéine, afin d'obtenir la totalité de la protéine ISCU sous une forme persulfurée. Après avoir éliminé la L-cystéine en excès, la réaction de réduction du persulfure d'ISCU est initiée avec l'ajout du DTT et stoppée aux temps indiqués dans la **Figure IV. 19**.

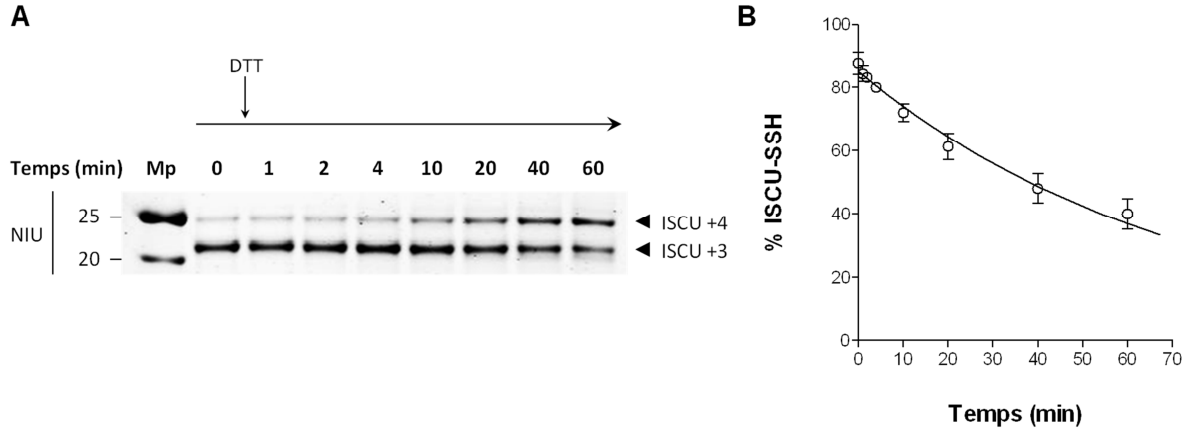


Figure IV. 19. Cinétique de réduction du persulfure d'ISCU, du complexe NIU, par le DTT. A. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de réduction du persulfure d'ISCU du complexe NIU (25 µM) avec 50 équivalents de DTT. Le marqueur de poids moléculaire est en kDa. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(4)**.

Les résultats montrent qu'en absence de DTT (t = 0 de la **Figure IV. 19**, **A**), la protéine ISCU est majoritairement sous sa forme persulfurée (ISCU +3), avec une très faible quantité de protéine totalement réduite (ISCU +4, < 5 %). Après 60 minutes en présence de DTT, on distingue une augmentation de la bande correspondant à ISCU +4, indiquant la réduction du persulfure d'ISCU. Nous avons ensuite quantifié le gel SDS-PAGE et nous avons supposé que la réduction du persulfure d'ISCU par le DTT est une réaction bimoléculaire avec une dégénérescence de l'ordre de la réaction menant à l'équation **(4)** :

$$[\textbf{ISCU-SSH}] = \textbf{A} \,.\, \textbf{exp}^{(-\,k_{R2}\,.\,[DTT]_0\,.\,t)}$$

Où A correspond à la quantité totale d'ISCU-SSH formés au cours de la réaction, k_{R2} est la constante de vitesse de la réaction de réduction du persulfure d'ISCU, $[DTT]_0$, la concentration initiale en DTT et t, le temps. Le graphique obtenu indique qu'après une heure de réaction, près de 60 % d'ISCU-SSH est réduit. Nous avons déterminé une constante de vitesse de la réduction d'ISCU-SSH par le DTT, k_{R2}, de 0,21 ± 0,02 $M^{-1}.s^{-1}$ (**Figure IV. 19**, **B**).

La protéine NFS1 est également sous une forme totalement persulfurée et donc la réduction du persulfure de NFS1 se produit simultanément à celle d'ISCU-SSH. Nous nous sommes alors interrogés sur l'effet de la persulfuration d'ISCU sur la vitesse de réduction du persulfure de NFS1, car ces deux phénomènes pourraient être interdépendants. Nous avons donc comparé les vitesses de ces réactions avec un complexe NIU ayant réagi pendant quelques minutes avec de L-cystéine, afin de ne générer que très peu de persulfure sur ISCU et un complexe dans lequel ISCU est totalement persulfurée (non montré). Nous n'avons pas observé de différence de vitesses de réduction, ce qui indique que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 ne dépend pas du niveau de persulfuration d'ISCU.

	NI	**NIU**
k_F (s^{-1})	> 0,23 ± 0,04	> 0,261 ± 0,004
k_T (s^{-1})	-	0,0018 ± 0,0004
k_{R1} ($M^{-1}.s^{-1}$)	2,0 ± 0,1	0,55 ± 0,05
k_{R2} ($M^{-1}.s^{-1}$)	-	0,21 ± 0,02

Tableau IV. 3. Récapitulatif des constantes de vitesse déterminées.

Le **Tableau IV. 3** résume toutes les constantes de vitesse des réactions de formation et de réduction des persulfures sur NFS1 et sur ISCU déterminées grâce au test d'alkylation par le $MalP_{16}$. Nous constatons que la constante de vitesse de réduction du persulfure de NFS1, k_{R1}, est environ 3 fois plus élevée que la constante de vitesse de réduction du persulfure d'ISCU, k_{R2}. Cette observation soulève une nouvelle question concernant la contribution du persulfure d'ISCU dans la mesure de l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des mesures en cycle multiple.

G . Analyse de l'activité cystéine désulfurase en cycle multiple

G . 1 . Identification de l'étape limitante

Nous avons évoqué plus haut que la mesure de l'activité cystéine désulfurase représente le comportement de la réaction la plus lente ; et les cinétiques en cycle unique (test d'alkylation) indique que c'est la réduction des persulfures qui est l'étape limitante. Nous avons donc cherché à confirmer que la réaction cinétiquement déterminante est toujours la réduction des persulfures en cycle multiple. Pour cela, nous avons mesuré les activités cystéine désulfurase des complexes NI et NIU (20 µM), incubés avec de la L-cystéine et des concentrations croissantes de DTT. Le DTT n'intervenant que dans la réaction de réduction, ces expériences devraient nous permettre de déterminer si la réduction est la réaction limitante.

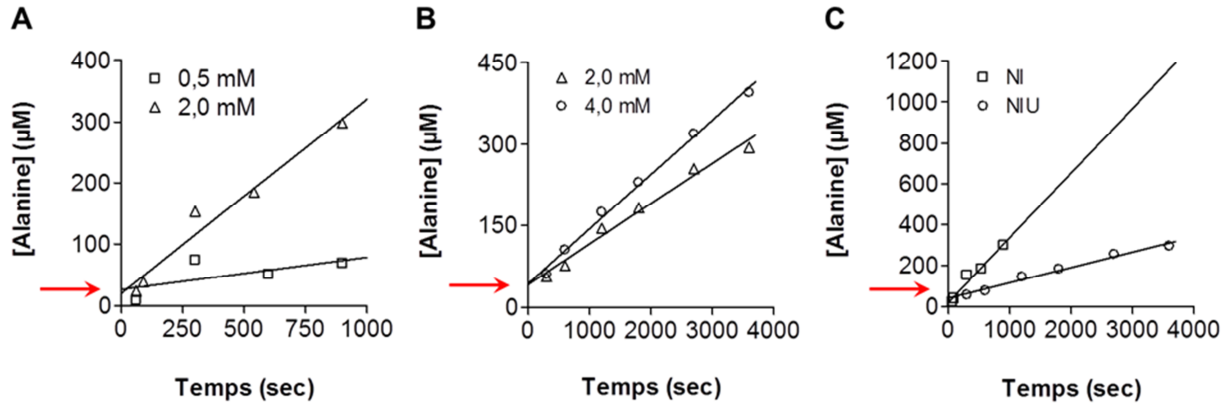


Figure IV. 20. Formation de l'alanine par les complexes NI et NIU en fonction du temps. A. Formation de l'alanine en fonction du temps du complexe NI (20 µM) avec 2 mM de L-cystéine et 500 µM ou 2 mM de DTT. **B.** Formation de l'alanine en fonction du temps du complexe NIU (20 µM) avec 2 mM de L-cystéine et 2 mM ou 4 mM de DTT. **C.** Comparaison de la formation d'alanine en fonction du temps des complexes NI et NIU (20 µM) pour 2 mM de L-cystéine et 2 mM de DTT.

La **Figure IV. 20** nous montre que l'activité cystéine désulfurase des complexes NI et NIU augmente avec la concentration en DTT (**Figure IV. 20**, **A** et **B**). Ces résultats indiquent donc que la réaction limitante est la réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU. De plus, nous remarquons que les droites, simulées à partir des données expérimentales, ne coupent pas l'axe des ordonnées par 0 mais plutôt vers 20 µM (flèches rouges de la **Figure IV. 20**). Cette concentration correspond à la quantité de complexe utilisée au cours de l'expérience.

Ainsi, les résultats indiquent que dès les premières secondes de réaction, 20µM d'alanine sont produites, correspondant à la formation du persulfure de NFS1, ce qui indique que la formation de ce persulfure est très rapide devant sa réduction par le DTT. Nous avons confirmé que la concentration d'alanine générée dans les premières secondes de la réaction correspond à la concentration initiale de complexe ; et donc que ce « burst » initial représente le premier demi-cycle de réaction générant un équivalent d'alanine par complexe (**Figure IV. 21**) (Cf. **Figure IV. 1**, réaction **1**).

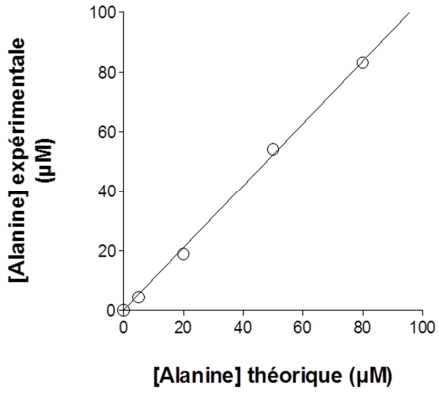


Figure IV. 21. Mesure de l'alanine après 10 secondes de réaction pour différentes concentrations du complexe NFS1-ISD11. Différentes concentrations de complexe NI ont été incubées avec 20 équivalents de L-cystéine. L'alanine a été dosée 10 secondes après le début de la réaction.

G . 2 . Mécanisme de réduction

Nous avons poursuivi les analyses cinétiques du système, en déterminant les paramètres cinétiques de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU. Nous avons donc réalisé des expériences où les complexes NI et NIU ont été incubés en présence de concentrations croissantes en substrat.

Lors de cette étude, nous avons constaté qu'en absence de DTT, l'activité cystéine désulfurase des deux complexes n'était pas nulle et qu'elle augmente avec la concentration en L-cystéine (**Figure IV. 22**, **A**). De plus, les quantités de L-alanine générées sont supérieures à la concentration du complexe NFS1-ISD11, ce qui indique que plusieurs cycles catalytiques ont été réalisés en présence de L-cystéine. Ces résultats montrent donc la L-cystéine, substrat de NFS1 pour la formation de son persulfure, est également capable de réduire les persulfures de NFS1 et/ou d'ISCU. Nous avons également constaté que de même qu'avec le DTT, les droites ne coupent pas l'axe des ordonnées en zéro et que l'effet « inhibiteur » de la protéine

ISCU sur l'activité cystéine désulfurase de NFS1-ISD11 est toujours observé (**Figure IV. 22**, **B** et **C**). Ces résultats indiquent clairement que la réduction des persulfures est toujours l'étape limitante du cycle catalytique de l'enzyme quand la L-cystéine est le réducteur (Cf. **Annexe 20**).

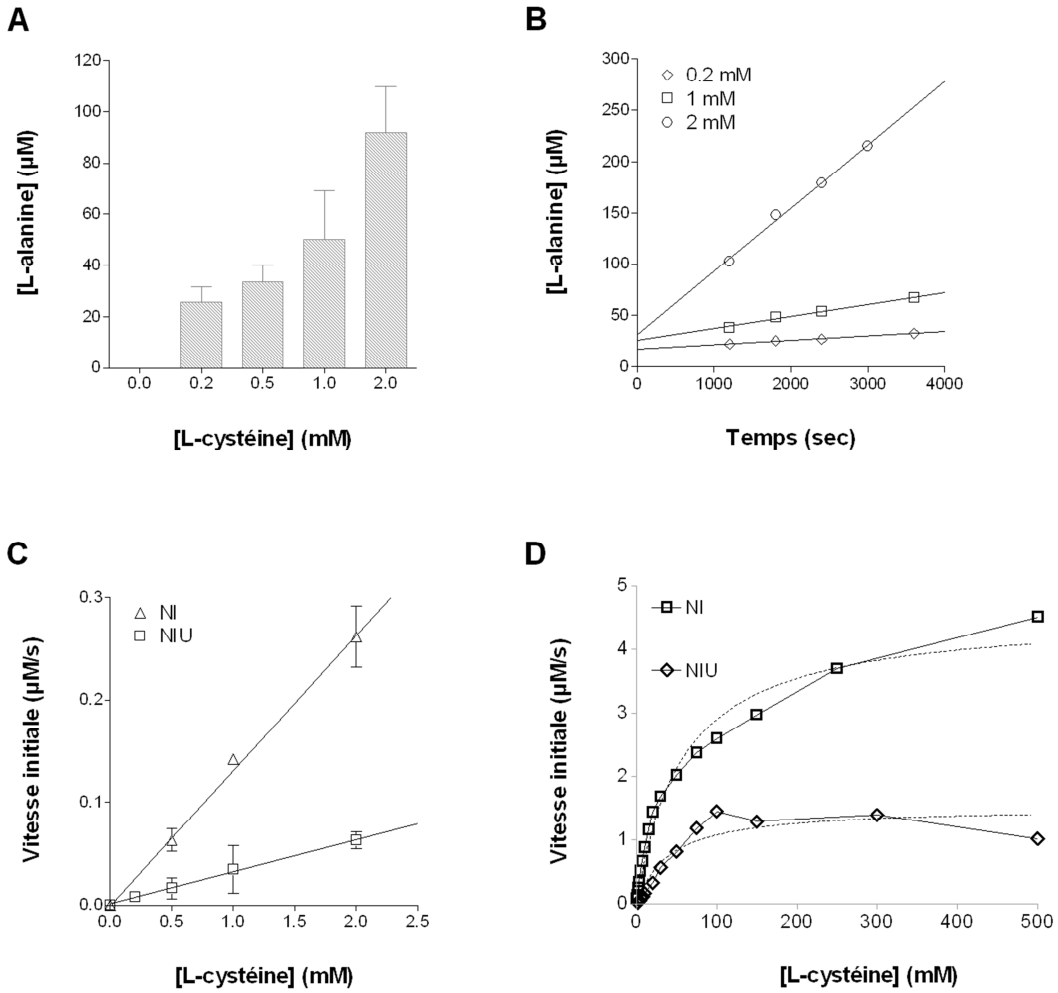


Figure IV. 22. Etude de la réduction des persulfures des complexes NI et NIU par la L-cystéine. A. La quantité d'alanine formée par le complexe NIU (20µM) a été mesurée avec des concentrations initiales en L-cystéine croissantes. **B.** Les cinétiques de production d'alanine du complexe NIU (20 µM), avec des concentrations croissantes en L-cystéine ont été réalisées par l'intermédiaire de 4 points de cinétique. Les lignes noires représentent les régressions linéaires tracées à partir de ces points. La pente de ces droites nous permet de calculer les vitesses initiales de réaction. **C** et **D.** Les vitesses initiales des activités cystéine désulfurase ont été mesurées et calculées pour les complexes NI et NIU (20µM), avec des concentrations croissantes de L-cystéine. **C**. Les lignes noires représentent les régressions linéaires obtenues à partir de ces points. **D**. Les lignes continues correspondent à la reliure des points expérimentaux et les lignes en pointillé représentent les simulations des données expérimentales avec une équation du type Michaelis et Menten (Vitesse initiale = Vitesse max * [L-cys] / (K_M + [L-cys])).

Pour étudier la réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU en cycle multiple, nous avons réalisé des expériences en conditions d'état stationnaire, c'est-à-dire, une situation dans laquelle la vitesse de la réaction ne varie pas, car la concentration en substrat est supposée constante (*i.e.* le substrat est présent en large excès) (**Figure IV. 22**, **B**). Nous nous sommes

également placés à des temps suffisamment long pour nos mesures, afin de nous affranchir du régime pré-stationnaire de début de réaction, au cours duquel se produisent les réactions de formation du persulfure de NFS1 et de transpersulfuration. Les cinétiques de formation de L-alanine ont donc été mesurées 20 minutes après le début de la réaction pour le complexe NIU, ce qui correspond au temps nécessaire pour réaliser la transpersulfuration dans le complexe NIU ; et l'alanine générée par le complexe NI a été dosée après 1 minute de réaction. Nous avons ensuite vérifié que la consommation en substrat ne dépasse pas 30 % de sa concentration initiale, sachant que nous avons considéré que 3 cystéines étaient nécessaires au total ; une pour la formation du persulfure sur NFS1 et 2 pour la réduction. Nous avons également contrôlé que notre système était bien dans un état stationnaire en vérifiant que la production d'alanine était linéaire en fonction du temps à quatre temps différents (**Figure IV. 22**, **B**).

Les vitesses initiales ont été déterminées à partir de la régression linéaire obtenues avec les quatre points de cinétique (**Figure IV. 22**, **B**). L'étude montre que jusqu'à 2 mM de L-cystéine, la vitesse initiale de la réduction des persulfures augmente de manière linéaire (**Figure IV. 22**, **C**). Au-delà d'environ 5 mM nous avons observé que les vitesses initiales n'évoluent plus de manière linéaire et décrivent ce qui ressemble à une courbe de saturation, indiquant la formation d'un complexe enzyme-substrat (**Figure IV. 22**, **D**). L'analyse à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten de ces courbes conduit à des constantes de Michaelis (K_M), de l'ordre de 50 à 150 mM Cependant, des valeurs 1000 fois plus petites, de l'ordre de 10 µM à 40 µM, ont été obtenues par les groupes de D. Barondeau et H. Puccio avec 1 µM d'enzyme. Ces valeurs de K_M semblent donc dépendre de la concentration en enzyme, ce qui n'est pas compatible avec un modèle enzyme-substrat de type Michaelis-Menten. Au contraire, une variation linéaire indique que la L-cystéine ne possède pas de site de fixation à l'enzyme ; et donc que le mécanisme de la réaction est de type bimoléculaire.

Nous avons ensuite cherché à identifier le persulfure réduit par le DTT ou la L-cystéine ; est-ce celui de NFS1 ou celui d'ISCU, ou bien les persulfures des deux protéines sont-ils réduits simultanément ? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé le mutant C104S ainsi que le mutant C104G d'ISCU.

G . 3 . Etude des mutants C104S et C104G d'ISCU

Nous avons démontré un peu plus haut dans ce chapitre que la mutation de la cystéine C104 en sérine empêche la formation de persulfure sur la protéine ISCU. L'interaction entre NFS1 et ISCU^{C104S} ou ISCU^{C104G} n'étant pas altérée par la mutation de la cystéine C104 (Cf. Chapitre III), nous avons cherché à déterminer la contribution de la réaction de réduction du persulfure d'ISCU. Pour cela, le complexe NFS1-ISD11 (20 µM) a été incubé avec de la L-cystéine et du DTT en présence ou non d'un équivalent de la protéine ISCU sauvage ou des mutants C104S et C104G d'ISCU.

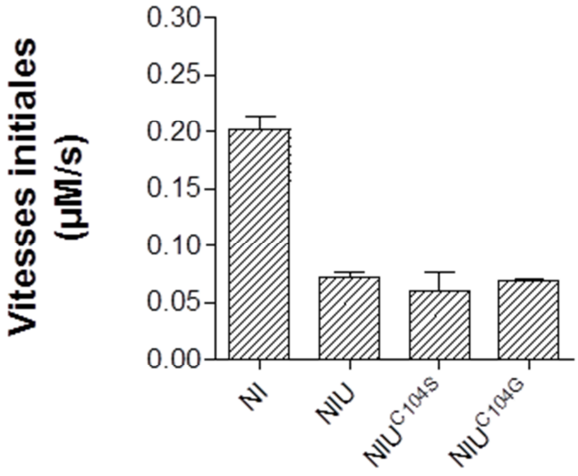


Figure IV. 23. Diagramme des vitesses initiales obtenues pour chacun des complexes NI, NIU, NIU^{C104S} et NIU^{C104G}. Le complexe NI (20 µM) avec ou sans ISCU WT ou les mutants C104S et C104G d'ISCU, en présence de 500 µM de L-cystéine et 1 mM de DTT.

La **Figure IV. 23** représente les vitesses initiales des activités cystéine désulfurase des quatre complexes NI, NIU, NIU^{C104S} et NIU^{C104G}. Les résultats indiquent que les complexes NIU^{C104S} et NIU^{C104G} ont des vitesses initiales identiques à celle de la protéine sauvage ; ce qui signifie qu'à un temps donné, la quantité d'alanine générée par ces trois complexes est similaire. Etant donné que les mutants C104S et C104G d'ISCU sont incapables de se persulfurer, ces résultats montrent que la réduction du persulfure d'ISCU, dans le complexe NIU, ne contribue pas, ou très peu, à l'activité cystéine désulfurase mesurée. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en cycle simple avec le test d'alkylation montrant que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 est trois fois plus rapide que celle du persulfure d'ISCU. Cette différence de vitesse semble donc suffisante pour qu'en cycle multiple, le persulfure d'ISCU ne contribue pas ou peu à l'activité cystéine désulfurase dosée.

H . Discussion – Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons cherché à comprendre l'effet « inhibiteur » de la protéine ISCU sur l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11.

Pour cela, nous avons mis au point un protocole permettant d'identifier et de quantifier les persulfures présents dans une protéine, à l'aide d'un maléimide modifié, le $MalP_{16}$, qui permet de générer des espèces de différentes tailles séparées par SDS-PAGE. D'autres techniques de visualisation des persulfures existent. La plus sensible utilise la L-cystéine-[^{35}S], mais cette méthode ne permet pas de quantifier simplement le niveau absolu de persulfuration d'une protéine, seules des valeurs relatives peuvent être obtenues (Pandey *et al.* 2012). De même, des maléimides greffés à des fluorophores, tel que le N-éthylmaléimide fluorescent, ont été utilisés, mais la sensibilité de ce test est limitée, car elle repose sur des différences d'intensité de fluorescence entre les conditions non réductrices et réductrices qui permettent de révéler le persulfure (par une réaction similaire à celle que nous avons utilisé pour le test avec les peptides maléimides) (Sen *et al.* 2012). Une troisième technique, nommée « tag-switch », a été élaborée par Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2014). Leur méthode permet une identification spécifique des protéines persulfurées, mais la protéine non persulfurée étant perdue avec cette méthode, aucune quantification du niveau de persulfuration n'est possible. Le test d'alkylation par le $MalP_{16}$, que nous avons développé, présente plusieurs avantages par rapport à ces méthodes. Il permet notamment de déterminer le nombre de cystéines persulfurées et de les quantifier. La rapidité de mise en œuvre, lié au nombre d'étape limitée de ce test, est un autre avantage par rapport aux autres techniques décrites ci-dessus.

Notre protocole nous a permis d'étudier individuellement les réactions de formation et de réduction du persulfure de NFS1. Tout d'abord, nous avons constaté que la protéine NFS1 catalyse la formation d'un persulfure sur une seule de ses cystéines, la cystéine catalytique C383. La réaction est quasiment terminée en 10 secondes et nous n'avons pas observé d'effet de la protéine ISCU au-delà de ces 10 secondes. De plus, nous avons montré par la suite que la L-cystéine est aussi un réducteur du persulfure de NFS1 ; et donc, que dans nos conditions où la cystéine était présente en excès, la quantité de persulfure observée est le résultat des deux réactions, la formation de NFS1-SSH et sa réduction par la L-cystéine, ce qui conduit à sous-estimer la constante de vitesse de formation du persulfure de NFS1, k_F. Il est donc probable que la réaction soit terminée bien avant 10 secondes. Etant donné la vitesse de cette

réaction, nous ne sommes pas parvenus à résoudre les cinétiques en dessous de 10 secondes et donc à déterminer si ISCU a un effet ou non sur la vitesse de cette réaction. Cependant, l'une des conclusions importantes de cette partie est qu'ISCU n'est pas nécessaire pour la formation du persulfure de NFS1.

Grâce à une analyse par spectrométrie de masse de la protéine entière, nous avons démontré que NFS1 est mono-persulfurée. Cependant, à la différence du test d'alkylation qui montre que NFS1 est totalement persulfurée, la spectrométrie de masse indique que 20% à 30% de NFS1 n'est pas persulfurée. L'hypothèse la plus probable est qu'une certaine quantité de persulfure est perdue au cours de l'analyse par spectrométrie de masse. En ce sens, il serait intéressant de protéger les persulfures par alkylation afin de déterminer si ce sont bien les conditions d'analyse qui sont responsables de cette perte. Cependant nos efforts n'ont pas porté leurs fruits, car en cherchant à alkyler la protéine par l'IAM et le NEM en absence de SDS, gênant pour les analyses par spectrométrie de masse, nous ne sommes pas parvenus à alkyler toutes les cystéines de NFS1.

Nous avons ensuite cherché à caractériser un transfert de soufre entre les protéines NFS1 et ISCU. Un transfert de soufre, entre la cystéine désulfurase et la protéine d'échafaudage, avait déjà été mis en évidence chez les procaryotes. Nous avons profité du test d'alkylation pour étudier le comportement de la protéine ISCU en présence du complexe NFS1-ISD11 et de L-cystéine. Nous avons constaté qu'un persulfure se forme sur une seule cystéine d'ISCU. La spectrométrie de masse montre que cette cystéine est mono-persulfurée. De plus, nous avons pu démontrer que ce transfert est direct entre la cystéine persulfurée de NFS1 et l'une des cystéines d'ISCU, probablement par une attaque nucléophile du thiol d'une des cystéines d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure de NFS1. C'était la première fois, qu'un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU eucaryotes était observé. Lors de l'écriture de ce manuscrit, l'équipe de David Barondeau a publié un article montrant également un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, en utilisant de la L-cystéine-[^{35}S] (Bridwell-Rabb *et al.* 2014). Etonnamment, les résultats que nous avons observés sont très différents du système ISC bactérien, où la protéine IscU est caractérisée par un mélange de formes poly-persulfurées sur ses trois cystéines, suggérant que le transfert de soufre n'est pas spécifique d'une cystéine en particulier.

Nous nous sommes alors interrogés sur l'identité de la cystéine d'ISCU persulfurée. Nous avons analysé un mélange réactionnel des protéines NFS1-ISD11 et ISCU, après une

digestion tryptique, sur un spectromètre de masse haute résolution, le LTQ-Orbitrap XL. Etonnamment, nous avons constaté que deux cystéines sur les quatre que contient ISCU sont persulfurées, les cystéines C35 et C104. Cependant les analyses quantitatives indiquent que la cystéine C104 est la cystéine majoritairement persulfurée (65 %). De plus, en absence de L-cystéine un persulfure est également détecté sur la cystéine C104, qui correspond probablement au persulfure généré de manière endogène au cours de l'expression de la protéine dans les bactéries. Ce résultat conforte l'idée que la persulfuration de cette cystéine se produit également en conditions physiologiques dans un organisme hétérologue. Une faible quantité de persulfure est détectée sur la cystéine C35 (5 %), suggérant que cette cystéine pourrait intervenir dans le processus de transpersulfuration. L'étude des mutants ponctuels C35S et C104S d'ISCU nous a permis de montrer que ces deux cystéines interviennent dans le processus de transfert de soufre, car la persulfuration d'ISCU est bloquée avec ces deux mutants. Ces résultats suggèrent que la cystéine C35 est impliquée dans le transfert de soufre sur la cystéine C104. D'après la structure du complexe holo-(IscS-IscU)$_2$ publié par Marinoni *et al.* (Cf. **Figure I. 14**), la cystéine catalytique d'IscS et les trois cystéines conservées d'IscU sont proches les unes des autres ; avec les cystéines C35 et C61 (numérotation de NFS1 souris) placées respectivement dans les boucles 2 et 3 d'ISCU , et seule la cystéine C104 est positionnée à l'extrémité d'une hélice α (α6). D'après cette structure, il semble que la cystéine C35 soit la cystéine d'ISCU la plus proche de la cystéine catalytique de NFS1. Ces observations suggèrent que la cystéine C35 pourrait être la cible primaire de la transpersulfuration et que le persulfure de la cystéine C35 serait ensuite transféré sur la cystéine C104. Cependant, aucun persulfure n'est détecté sur ISCU avec le mutant C104S ; alors qu'une accumulation de persulfure sur la cystéine C35 est attendue dans le cadre de cette hypothèse de transit de persulfure des cystéines C35 vers C104. Il est possible que les mutations des cystéines C35 et C104 d'ISCU en sérine entrainent des distorsions du futur site de fixation du centre Fe/S, rendant le transfert de soufre impossible entre la cystéine catalytique de NFS1 et ISCU, par exemple, par éloignement des cystéines C35 et C104 vis-à-vis de la cystéine catalytique de NFS1.

A l'aide du test d'alkylation avec le MalP$_{16,}$ nous avons ensuite étudié les vitesses de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU. Nous avons constaté que les vitesses de formation des persulfures de NFS1 et d'ISCU étaient plus rapides que les vitesses de réduction de ces persulfures, indiquant que la réduction des persulfures est l'étape limitante du système. Ces observations ont été confirmées par des expériences de cinétiques en cycles

multiples réalisées à partir de mesures d'activités cystéine désulfurase. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres cystéines désulfurases montrant que la réduction du persulfure est également l'étape limitante du cycle catalytique de ces enzymes (Flint 1996; Mihara *et al.* 2000; Behshad *et al.* 2004). En parallèle, nous avons montré, à l'aide des mutants C104S et C104G d'ISCU, que le persulfure d'ISCU ne contribue pas à la formation de L-alanine, ce qui indique que seul le persulfure de NFS1 participe à la formation des ions sulfures nécessaires à la synthèse d'un centre Fe/S. De plus, nous avons établi que le ralentissement de la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 par le DTT n'est pas corrélé avec la présence d'un persulfure sur la protéine ISCU. L'ensemble de ces résultats montre que l'effet « inhibiteur » de la protéine ISCU sur l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 provient d'un ralentissement de la vitesse de réduction du persulfure de NFS1. Cet effet pourrait potentiellement s'expliquer par une diminution de l'accessibilité de la cystéine catalytique de NFS1 au solvant, probablement en raison de la formation du complexe ternaire.

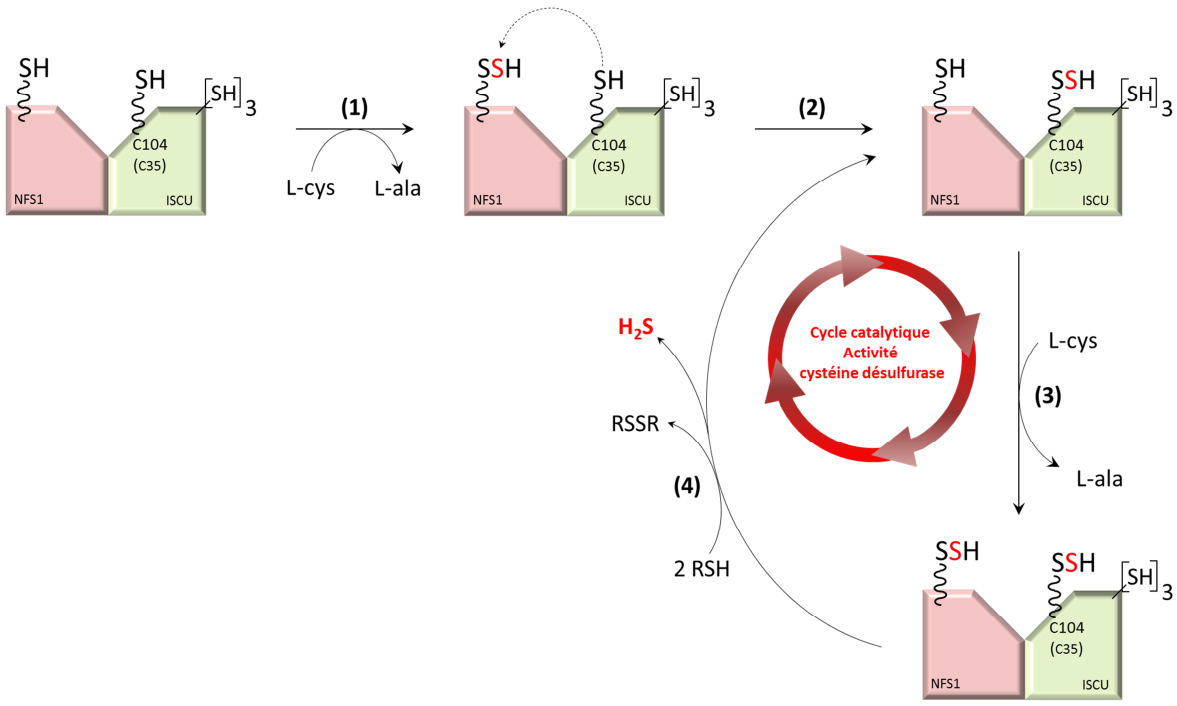


Figure IV. 24. Mécanisme séquentiel de formation et de réduction des persulfures du complexe NIU. Les protéines NFS1 et ISCU sont représentées de manière schématique, avec la cystéine catalytique de NFS1 et les quatre cystéines d'ISCU. **(1)** Formation du persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1. Nous avons démontré que cette réaction ne nécessite pas la présence de la protéine ISCU. **(2)** Transfert de soufre entre NFS1 et ISCU. La flèche en pointillé représente l'attaque nucléophile d'une des cystéines d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure de NFS1. **(3)** Formation d'un second persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1. Le complexe est maintenant doublement persulfuré. **(4)** Réduction des persulfures. Nous avons montré que seul le persulfure de NFS1 contribue à la formation des ions sulfures.

Enfin, nous avons observé, en régime stationnaire, que les vitesses initiales de réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine suivent des variations linéaires pour les

concentrations en L-cystéine inférieures à 5 mM puis décrivent ce qui ressemble à un plateau pour des concentrations plus élevées (c'est-à-dire au-delà de 250 équivalents). Les analyses avec un modèle de type Michaelis-Menten conduisent à des valeurs de l'ordre de 50 à 150 mM, incompatibles avec les valeurs déterminées par les groupes de D. Barondeau et H. Puccio, qui se situent entre 10 µM et 40 µM. De plus, des valeurs > 50 mM n'ont aucun sens physiologique étant donné que les concentrations physiologiques en L-cystéine (100 µM, (Ross-Inta *et al.* 2008)) sont bien inférieures. Ces résultats indiquent clairement que le modèle enzyme-substrat n'est pas valable dans ce cas. L'hypothèse la plus probable est qu'à des concentrations > 100 équivalents (de 10 à 1000 équivalents de L-cystéine ont été utilisés par Colin *et al.* et Tsai *et al.*), la L-cystéine exerce un effet inhibiteur, comme cela a été observé avec les cystéines désulfurase Slr0387 de *Synechocystis sp.* PCC 6803 et NifS d'*E. coli* (Mihara *et al.* 2000; Behshad *et al.* 2004). Notre conclusion est donc que la réduction du persulfure de NFS1 est un processus bimoléculaire, c'est-à-dire qu'il ne se forme pas de complexe enzyme-substrat entre le réducteur (DTT ou L-cystéine) et les complexes NI ou NIU. Cette conclusion est compatible avec les études réalisées par le groupe de Bollinger montrant que la réduction du persulfure de la cystéine désulfurase Slr0387 de *Synechocystis sp.* PCC 6803 par les thiols est un processus bimoléculaire (Behshad *et al.* 2004).

Chapitre V

Etude des effets de la protéine FXN sur les complexes NFS1-ISD11 et NFS1-ISD11-ISCU

Chapitre V. Etude des effets de la protéine FXN sur les complexes NFS1-ISD11 et NFS1-ISD11-ISCU

Nous venons d'étudier les effets de la protéine ISCU sur le complexe NI ; où nous avons notamment mis en évidence un transfert de soufre entre NFS1 et ISCU et démontré que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 est ralentie en présence d'ISCU. Nous allons maintenant nous intéresser à l'effet de la protéine FXN sur les complexes NI et NIU.

Il a été montré que la protéine FXN induit une activation de l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU mais n'a aucun effet sur le complexe NI (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013). Pour déterminer le mécanisme par lequel FXN active l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU, nous allons étudier l'effet de la protéine FXN sur les réactions individuelles de formation du persulfure de NFS1, de transpersulfuration et de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU grâce au test de détection des persulfures par alkylation au $MalP_{16}$. Nous allons également nous intéresser à différents mutants de la protéine ISCU, avec le mutant M106I, décrit comme pouvant reproduire l'effet de la frataxine sur la biogenèse des centres Fe/S *in vivo*, et les mutants portant sur la cystéine cible de la persulfuration (C104S, C104G). Nous étudierons également le mutant R162A de FXN qui cible une arginine pointant vers l'extérieur de la protéine qui nous est apparue comme un acide aminé pouvant participer au mécanisme d'activation de la frataxine. Comme pour le chapitre IV, nous allons tout d'abord tenter de reproduire les résultats de l'effet de FXN avant de nous intéresser au mécanisme.

A . Effets de la protéine FXN sur la formation et la réduction des persulfures dans le complexe NFS1-ISD11-ISCU

Nous avons mesuré l'effet de FXN sur l'activité cystéine désulfurase des complexes NI et NIU, en dosant l'alanine générée au cours de la réaction. La **Figure V. 1** montre que la protéine FXN n'a aucun effet sur l'activité cystéine désulfurase du complexe NI alors qu'elle stimule environ d'un facteur 6 l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU. Ces résultats

confirment que la protéine FXN stimule l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 uniquement en présence d'ISCU.

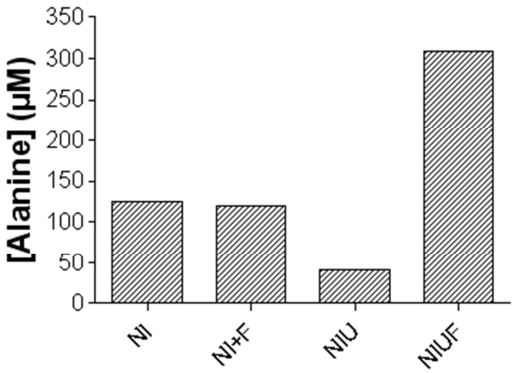


Figure V. 1. Activité cystéine désulfurase du mélange NI+F et du complexe NIUF. L'activité cystéine désulfurase de NFS1 dans les complexes NI (20µM) et NIU (20µM), avec ou sans FXN, en présence de 500 µM de L-cystéine et 1mM de DTT, a été mesurée en dosant l'alanine produit au cours du test.

Pour savoir si lors de ces expériences en cycle multiple, FXN agit sur les réactions de formation et/ou de réduction des persulfures d'ISCU et de NFS1, nous avons utilisé le test d'alkylation des protéines par le $MalP_{16}$ pour étudier séparément ces différentes réactions en cycle simple.

A . 1 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1

L'étude de la formation du persulfure sur NFS1 a été suivie par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$ et analysée par spectrométrie de masse en protéine entière.

A . 1 . 1 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1 étudiés par alkylation des protéine avec le $MalP_{16}$

Les complexes NI (25 µM) et NIU (25 µM) ont été incubés en présence d'un équivalent de FXN avec un excès de L-cystéine et la formation du persulfure sur NFS1 a été stoppée après 10, 20, 30 et 60 secondes de réaction. La **Figure V. 2** présente les cinétiques de formation du persulfure sur la protéine NFS1 obtenues pour les complexes NI et NIU en

présence de FXN, que nous avons comparé avec celles obtenues pour les complexes NI et NIU seuls.

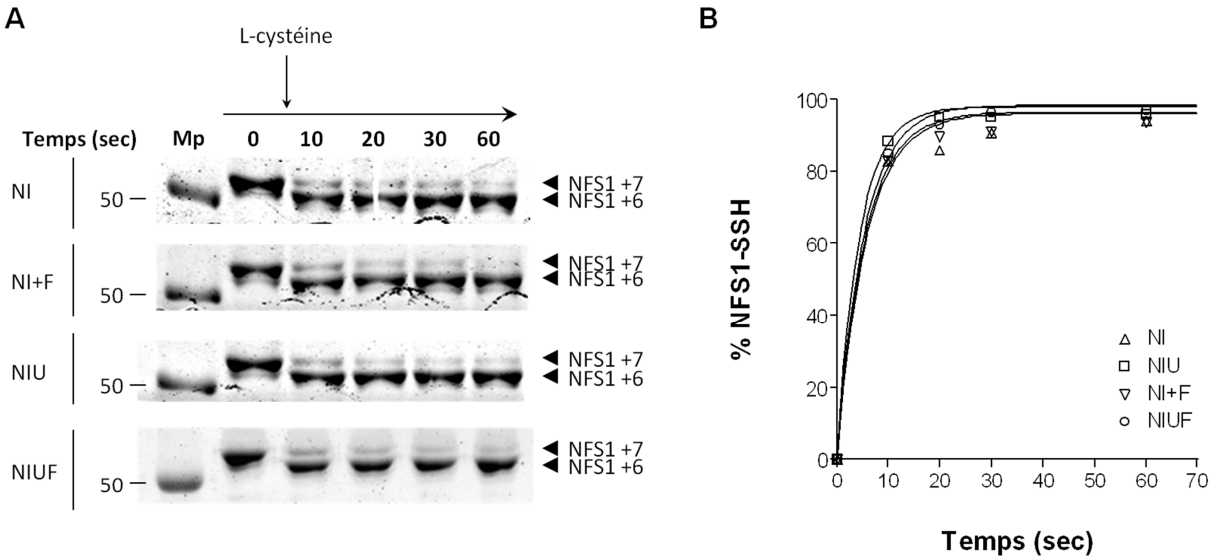


Figure V. 2. Etude de la formation du persulfure de NFS1 dans le mélange NI+F et le complexe NIUF. A. SDS-PAGE 8 % de la cinétique de formation du persulfure sur NFS1 des complexes NI, NIU et NIUF et le mélange NI+F (25 µM) en présence de 20 équivalents de L-cystéine. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(1)** (Cf. page n° 177).

Les résultats montrent des comportements similaires en absence et en présence de FXN pour les deux complexes, NI et NIU, avec une persulfuration quasi-totale de NFS1 après 10 secondes de réaction avec la L-cystéine (NFS1 +6) (**Figure V. 2**, **A**). De plus, la perte d'une seule unité $SucP_{16}$ indique qu'une unique cystéine de NFS1 est persulfurée dans tous les cas, probablement la cystéine catalytique (Cf. Chapitre IV). Les gels SDS-PAGE des complexes NI et NIU incubés en présence de FXN ont été quantifiés et la réaction de formation du persulfure sur NFS1 est décrite par l'équation **(1)** (Cf. Chapitre IV) (**Figure V. 2**, **B**). Etant donné que les cinétiques ne sont pas résolues en dessous de 10 secondes et que la réaction est quasiment terminée à 10 secondes, nous avons déterminé des constantes de vitesse minimales de formation de NFS1-SSH (k_F). Nous avons obtenu des valeurs de l'ordre de 0,2 s^{-1} pour les quatre conditions. De plus, ces résultats indiquent que de même que pour ISCU, FXN n'est pas requise pour la formation du persulfure de NFS1. Cependant, il n'est pas possible de déterminer si la protéine FXN a un effet ou non sur la vitesse de ces réactions. Nous avons ensuite analysé ces échantillons par spectrométrie de masse afin de déterminer la nature du persulfure formé sur la cystéine catalytique de NFS1 en présence de FXN.

A . 1 . 2 . Effets de la protéine FXN sur la formation du persulfure de NFS1 étudiés par spectrométrie de masse en protéine entière

Nous avons analysé les complexes NI et NIU (40 µM) incubés en présence de FXN après 3 minutes de réaction en présence de L-cystéine. Les deux échantillons ont ensuite été analysés comme décrit dans le chapitre II.

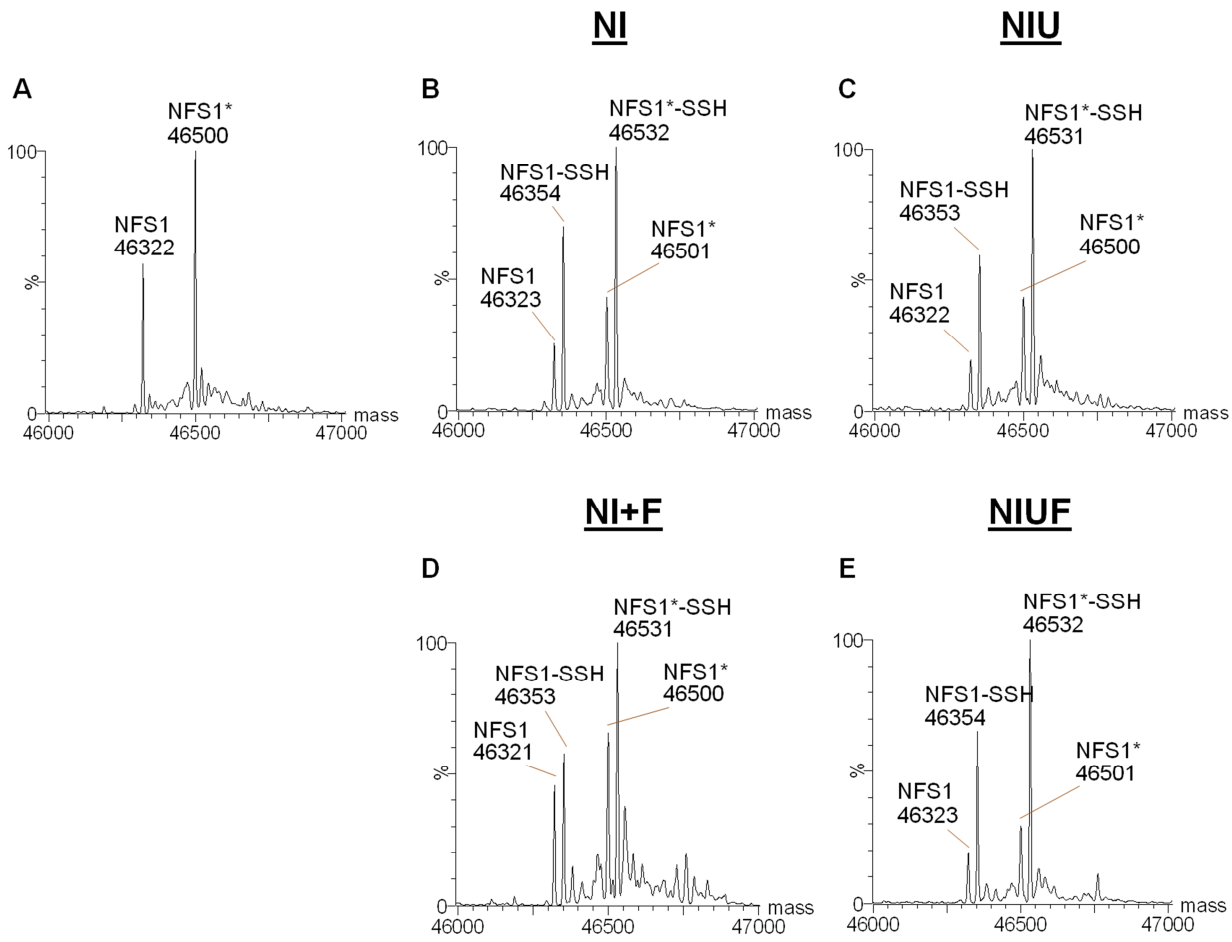


Figure V. 3. Spectres de masse ESI-Q/TOF reconstitués des complexes NI (B), NIU (C) et NIUF (E) et du mélange NI+F (D). Les complexes NI et NIU (40 µM), avec ou sans FXN, sont en présence de 10 équivalents de L-cystéine. Le spectre **A** correspond au complexe NI en absence de L-cystéine.

Les spectres de masse (**Figure V. 3**, **D** et **E**) montrent des profils semblables à ceux obtenus pour les complexes NI et NIU seuls (**Figure V. 3**, **B** et **C**). On retrouve quatre pics avec des masses de 46 321 ± 2 uma, 46 353 ± 2 uma, 46 500 ± 2 uma et 46 531 ± 2 uma pour le mélange NI+F et de 46 323 ± 2 uma, 46 354 ± 2 uma, 46 501 ± 2 uma et 46 532 ± 2 uma pour le complexe NIUF ; correspondant à NFS1 et sa forme N-gluconoylée, NFS1*, sous formes non persulfurées et mono-persulfurées. La protéine NFS1 est donc également mono-

persulfurée dans le mélange NI+F et le complexe NIUF. De plus, on remarque que la quantité de formes non persulfurées est variable d'un échantillon à l'autre, entre 20 % et 40 %, et que ces quantités ne sont pas corrélées avec les résultats du test d'alkylation. L'ensemble de ces observations renforce l'idée que la présence des formes non-persulfurées ne sont pas dues à une réaction partielle mais plutôt aux conditions de préparation des échantillons et/ou aux conditions d'analyse par spectrométrie de masse.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que pour chacun des complexes, NFS1 est mono-persulfurée en quelques secondes et que FXN n'est pas requise pour la formation de ce persulfure. Cependant, une étude publiée en 2013 a montré que Yfh1, l'homologue levure de FXN, stimule la fixation de la L-cystéine à Nfs1 et donc la formation du persulfure sur NFS1 (Pandey *et al.* 2013). Nous nous sommes donc intéressés à leur protocole pour comprendre l'origine de telles différences. Les auteurs ont réalisés des réactions avec 50 nM de complexe Nfs1-Isd11, en présence ou non d'Yfh1, et seulement 2 équivalents de L-cystéine. Nous avons donc étudié l'effet de la protéine FXN dans des conditions similaires.

A . 1 . 3 . Effet de la concentration en complexe et en L-cystéine sur la formation du persulfure de NFS1 en présence de FXN

Debkumar Pain et ses collaborateurs ont détecté les persulfures de Nfs1 en utilisant de la L-cystéine-[^{35}S] comme substrat. Malheureusement, par cette méthode, on ne peut pas connaître la quantité de protéine persulfurée ; et aucune analyse supplémentaire ne permet de savoir sous quelle forme Nfs1 est persulfurée (mono- ou poly-persulfurée). Malgré cela, ils ont montré que la quantité de persulfure sur Nfs1 est plus importante en présence d'Yfh1, indépendamment de la présence d'Isu1, l'homologue levure d'ISCU. Ces résultats sont contradictoires avec ce qui a été observé chez les mammifères, où la stimulation de l'activité du complexe NFS1-ISD11 par FXN n'est observée qu'en présence de la protéine ISCU. D'ailleurs les auteurs de cette étude n'expliquent pas non plus l'effet stimulateur de la protéine Yfh1 en absence d'Isu1 et ont proposé que le système levure soit différent du système mammifère (Pandey *et al.* 2013).

En analysant leur protocole nous avons remarqué qu'ils ont travaillé à de très faibles concentrations en protéines (50 nM environ), avec seulement 2 équivalents de L-cystéine, à 30°C pendant 15 minutes ; ce qui est très éloigné de nos conditions de travail. Nous nous

sommes donc placés dans les mêmes conditions pour vérifier si les effets observés sur la vitesse de formation du persulfure de NFS1 dépendent de la concentration en complexe et de la quantité de cystéine.

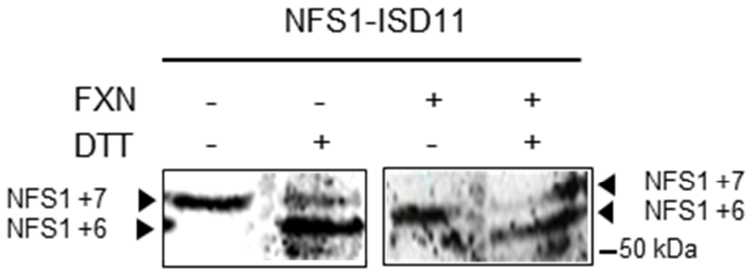


Figure V. 4.Etude de la formation du persulfure de NFS1 à 50nM, en présence ou non de FXN. SDS-PAGE 8 % en conditions dénaturantes (réductrices et non-réductrices) du complexe NI à 50 nM, en présence ou non de FXN, avec 2 équivalents de L-cystéine et 15 minutes d'incubation, où 100ng de NFS1 ont été déposés dans chaque puits.

Les 100 ng de protéine NFS1 déposés sur le gel ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie. La technique du western blot aurait été un choix plus judicieux ; mais la détection par l'anticorps primaire anti-NFS1 de la protéine NFS1 entièrement alkylée étant mauvaise, nous avons rapidement écarté cette option. Malgré une qualité médiocre, l'analyse SDS-PAGE montre que la très grande majorité de la protéine NFS1 est convertit sous sa forme persulfurée (NFS1 +6) après réaction avec deux équivalents de L-cystéine indépendamment de la présence de FXN (**Figure V. 4**). Ainsi, dans leurs conditions, nous avons obtenu des résultats différents des leurs, mais similaires aux nôtres.

Plusieurs raisons pourraient expliquer ces différences, soit le système levure fonctionne de manière complètement différente, ce qui nous semble peu probable ; ou bien la méthode de marquage au ^{35}[S] présente des artéfacts, comme nous avons pu l'observer avec l'analyse par spectrométrie de masse, où les persulfures non protégés (non alkylés) sont potentiellement échangeables.

Globalement nos résultats indiquent donc que FXN n'est pas requise pour la formation du persulfure de NFS1, mais ne nous permettent pas de dire si FXN stimule la vitesse de formation de ce persulfure. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la protéine FXN sur la formation du deuxième persulfure du système, le persulfure d'ISCU.

B . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre de NFS1 vers ISCU

B . 1 . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre étudiés par alkylation au $MalP_{16}$

Nous avons comparés les cinétiques de transfert de soufre dans les complexes NIU et NIUF (**Figure V. 5**).

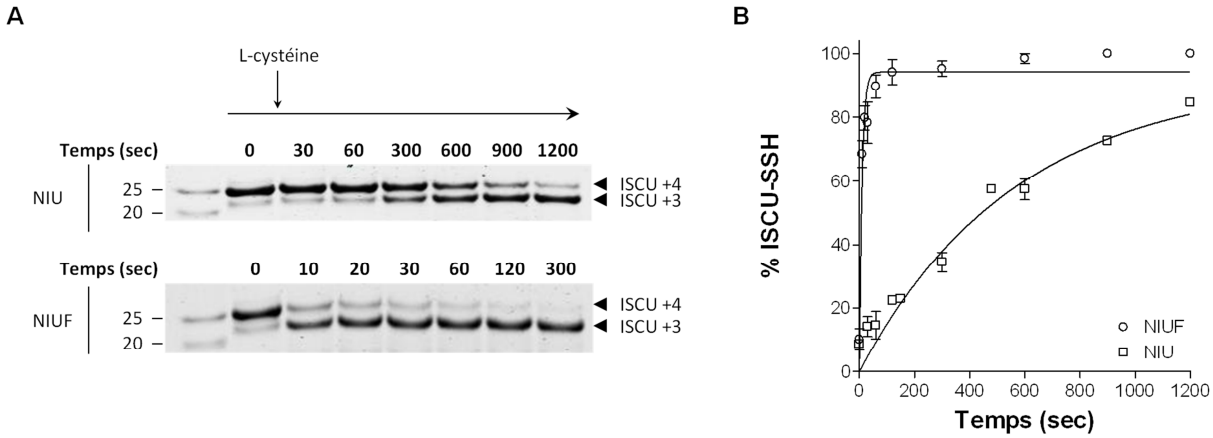


Figure V. 5. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans le complexe NIUF. A. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de formation du persulfure sur ISCU des complexes NIU et NIUF (25 µM) en présence de 20 équivalents de L-cystéine. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(2)** (Cf. page n° 184).

L'analyse SDS-PAGE révèle qu'en présence de FXN, la protéine ISCU est quasiment totalement persulfurée en seulement 10 secondes de réaction, alors qu'il faut attendre 20 minutes pour persulfurer entièrement ISCU en absence de FXN (**Figure V. 5**, **A**). Ces résultats montrent que FXN accélère la réaction de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU. La perte d'une seule unité $SucP_{16}$ indique également qu'ISCU est persulfurée sur une seule de ses cystéines.

Les gels ont été quantifiés et la réaction de transfert de soufre a été modélisée par un processus unimoléculaire décrit par l'équation **(2)** (**Figure V. 5**, **B**, Cf. Chapitre IV). De même que pour la formation du persulfure de NFS1, la réaction de transfert n'étant pas résolue en deçà de 10 secondes, nous avons déterminé une constante minimale de 0,10 ± 0,02 s^{-1} pour le complexe NIUF ; à comparer à la constante de 0,0018 ± 0,0004 s^{-1}, déterminée précédemment

en absence de FXN, dans le complexe NIU. Ces valeurs indiquent que la protéine FXN stimule le transfert de soufre par un facteur d'environ 50.

L'étude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU montre que ce transfert est également direct en présence de FXN (**Figure V. 6**).

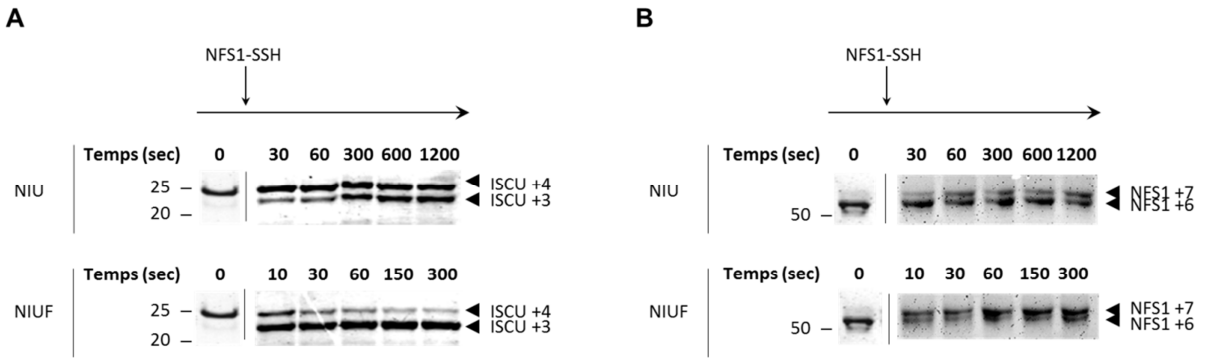


Figure V. 6. Etude de la réaction de transfert entre NFS1 et ISCU dans le complexe NIUF. Cinétique de formation du persulfure sur ISCU (**A**) corrélée à la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 (**B**) des complexes NIU et NIUF (25 µM). L'expérience de transfert de soufre a été réalisée sans cystéine, après l'ajout de NFS1-SSH.

Enfin, nous avons cherché à identifier la cystéine cible d'ISCU lors de ce transfert de soufre entre NFS1 et ISCU en présence de FXN. Pour cela, nous avons analysé une digestion tryptique du complexe NIUF, avant et après réaction avec la L-cystéine, sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (**Tableau V. 1**). En absence de L-cystéine, aucune cystéine d'ISCU n'est modifiée par un persulfure. Après 1 minute de réaction avec la L-cystéine, de même que pour le complexe NIU, on retrouve les cystéines C35 et C104 d'ISCU persulfurées ; à hauteur de 60 % pour la cystéine C104 et 2 % pour la C35 (Cf. **Annexe 18** et **19**). Ces valeurs sont très proches de ce que nous avions observé avec le complexe NIU (Cf. Chapitre IV), ce qui indique qu'en présence de FXN, le mécanisme de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU est conservé ; avec la cystéine C104 d'ISCU majoritairement persulfurée.

Cystéine	Masses attendues			NIUF sans L-cystéine		NIUF avec L-cystéine	
	Cam	S-Cam	(O_2)-Cam	Cam	S-Cam	Cam	S-Cam
C35	1645,80356	1677,77567	1677,79336	1645,80766	ND	1645,80437	1677,7758
C61	1971,94796	2003,92007	2003,93776	1971,95049	ND	1971,95293	ND
C96	955,52806	987,50017	987,51786	955,52904	ND	955,52898	ND
C104	1387,67076	1419,64287	1419,66056	1387,67082	ND	1387,66973	1419,64275

Tableau V. 1. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF. Résumé des résultats obtenus après analyse des peptides des protéines NFS1, ISD11, ISCU et FXN par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL. En absence de L-cystéine, aucun persulfure n'est détecté ; alors qu'en présence de L-cystéine, les cystéines C35 et C104 d'ISCU sont persulfurées respectivement à 60 % et 2 %.

Pour connaître la nature du persulfure (mono- ou poly-persulfure) d'ISCU, nous avons analysé ces échantillons par spectrométrie de masse en protéine entière.

B . 2 . Effets de le protéine FXN sur le transfert de soufre étudiés par spectrométrie de masse en protéine entière

Nous avons analysé les protéines après 3 minutes de réaction du complexe NIU avec la L-cystéine et en présence de la protéine FXN.

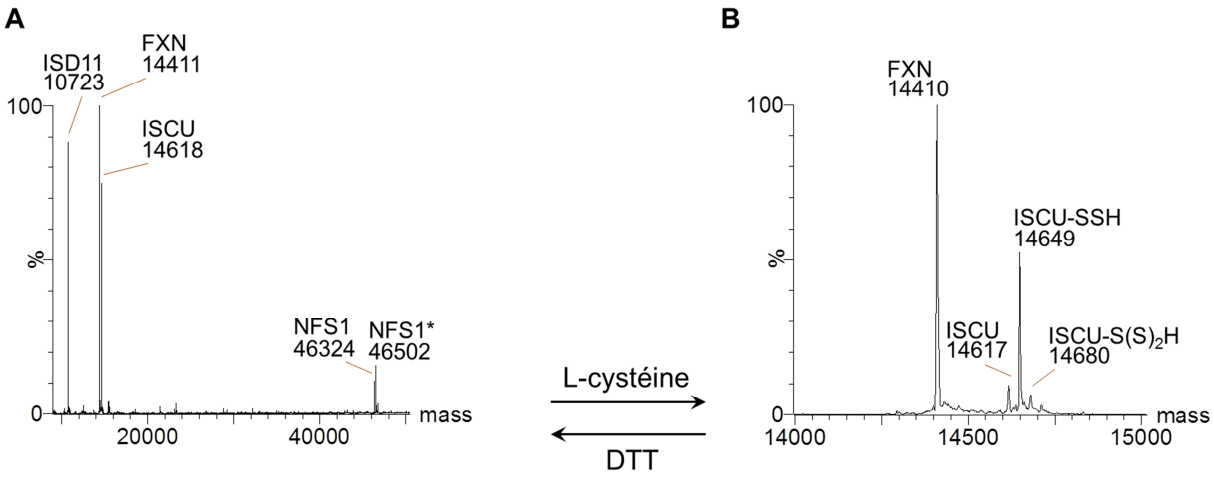


Figure V. 7. Spectres de masse ESI-Q/TOF reconstitués du complexe NIUF en absence (A) ou en présence (B) de L-cystéine. Le complexe NIUF (40 µM) est en absence (**A**) ou en présence de 10 équivalents de L-cystéine (**B**).

Le spectre **A** de la **Figure V. 7** montre 5 pics avec des masses de 10 723 ± 2 uma, 14 411 ± 2 uma, 14 618 ± 2 uma, 46 324 ± 2 uma et 46 502 ± 2 uma, correspondant respectivement aux protéines ISD11, $FXN_{79\text{-}207}$ (masse attendue, 14 411 Da), ISCU, NFS1 et

NFS1*. En absence de L-cystéine, la protéine ISCU est présente sous une forme totalement réduite (aucun persulfure n'est détecté). En présence de L-cystéine, le spectre **B** de la **Figure V. 7** montre que la protéine ISCU est caractérisée par 3 pics de masses différentes, à 14 617 ± 2 uma, 14 649 ± 2 uma et 14 680 ± 2 uma. Le pic majoritaire (14 649 ± 2 uma) correspond à un gain de masse de 32 Da par rapport à la masse initiale de la protéine ISCU, qui est compatible avec la forme persulfurée d'ISCU. Un pic minoritaire est également observé (14680 ± 2 uma), avec un gain de masse de 64 Da, qui concorde avec une forme doublement persulfurée. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$. Cependant, un second persulfure est également détecté sur la protéine par spectrométrie de masse en protéine entière ; alors qu'aucune bande correspondant à « ISCU +2 », soit deux persulfures présents sur deux cystéines différentes d'ISCU, n'est visible sur les gels d'alkylation. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la spectrométrie de masse est une technique d'analyse beaucoup plus sensible que l'électrophorèse après coloration au bleu de Coomassie ; ou bien par la différence de temps de réaction du complexe NIUF avec de la L-cystéine, étant de 1 minute pour l'alkylation et de 3 minutes pour l'analyse en masse. La première hypothèse est renforcée par les analyses LTQ-Orbitrap XL de la digestion tryptique du complexe NIUF, qui a également été incubé 1 minute en présence de L-cystéine et qui montre que deux cystéines différentes d'ISCU sont persulfurées, avec une plus grande quantité de cystéine C104 persulfurée par rapport à la cystéine C35. Ainsi, le test d'alkylation nous permet d'observer une situation dominante, dans laquelle une seule cystéine d'ISCU est persulfurée ; et la spectrométrie de masse nous informe qu'une très faible quantité de la protéine ISCU existe avec une seconde cystéine persulfurée.

Ces résultats montrent que de même qu'en absence de FXN, en présence de FXN la protéine ISCU est toujours majoritairement mono-persulfurée sur une seule de ses cystéines. Nous avons démontré que la vitesse de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU est stimulée en présence de FXN. Nous avons également montré qu'en présence de FXN, aussi bien qu'en son absence, ISCU est majoritairement persulfurée sur la cystéine C104 et qu'une très faible quantité est détectée sur la cystéine C35. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de la frataxine sur les mutants C35S et C104S d'ISCU.

B . 3 . Effets de la protéine FXN sur le transfert de soufre entre NFS1 et les mutants C35S et C104S d'ISCU

Le complexe NFS1-ISD11 (25 µM) a été incubé avec un équivalent du mutant C35S ou C104S d'ISCU et en présence de FXN. La réaction a été initiée avec un excès de L-cystéine et stoppée au temps indiqués dans la **Figure V. 8**.

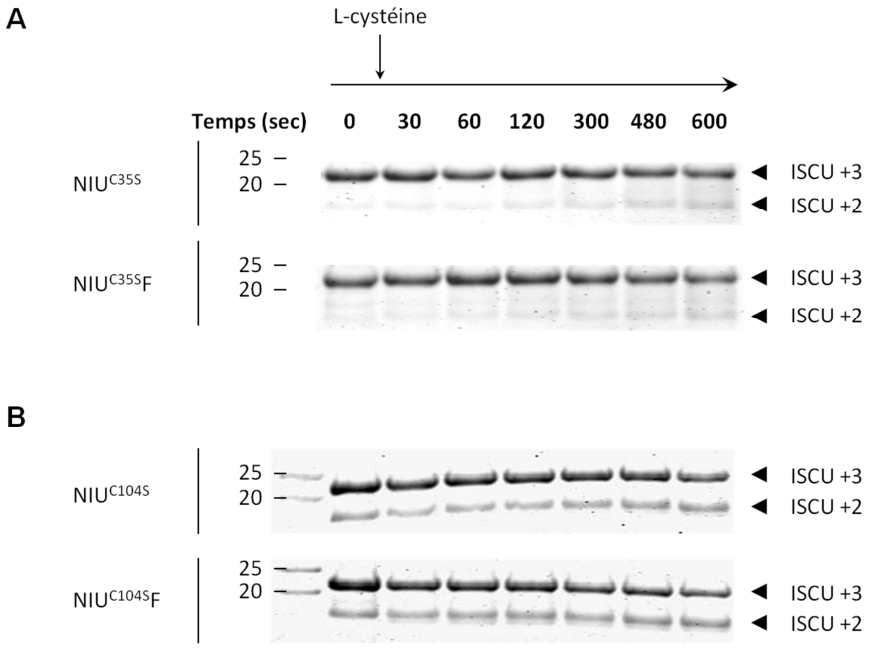


Figure V. 8. Cinétique de formation du persulfure d'ISCU dans les complexes quaternaires avec les mutants C35S et C104S d'ISCU. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de transfert de soufre des complexes NIU^{C35S} et NIU^{C35S}F (**A**) et NIU^{C104S} et NIU^{C104S}F (**B**) (25 µM) avec 20 équivalents de L-cystéine.

En présence de FXN, le test d'alkylation montre que la quantité de persulfure sur les protéines ISCU^{C35S} et ISCU^{C104S} ne varie pas par rapport à l'état initial (**Figure V. 8**), ce qui suggère que FXN n'a aucun effet sur ces deux complexes ternaires. Ce résultat était attendu, car les analyses de formation des complexes par chromatographie d'exclusion de taille indiquaient que ces mutations empêchent l'interaction de FXN avec le complexe NIU (Cf. Chapitre III). De plus, lorsque que l'on mesure les activités cystéine désulfurase des complexes NIU^{C35S} et NIU^{C104S}, en présence ou en absence de FXN, on constate que les valeurs des vitesses initiales sont identiques à celle du complexe NIU sauvage ; et que la stimulation de l'activité cystéine désulfurase observée en présence de FXN est totalement abolit (**Figure V. 9**).

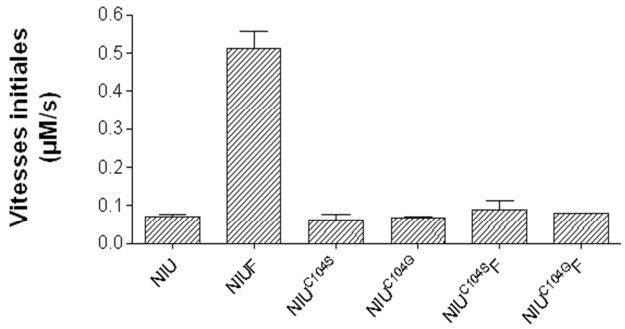


Figure V. 9. Vitesses initiales mesurées par les activités cystéine désulfurase des complexes NIU, NIU^{C104S}, NIU^{C104G} en présence ou non de frataxine. Le complexe NI (20 µM) avec ISCU WT ou les mutants C104S et C104G d'ISCU, en présence ou non de FXN, a été incubé avec 500 µM de L-cystéine et 1 mM de DTT.

L'ensemble de nos résultats indique donc que la protéine FXN stimule la réaction de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, conduisant à la formation d'un persulfure majoritairement sur la cystéine C104 d'ISCU. Nous avions montré dans le chapitre précédent que le persulfure d'ISCU n'intervenait pas dans la production globale d'ions sulfures. Nous avons donc cherché à déterminer si cette activation du transfert de soufre permet d'expliquer la stimulation de l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU en présence de FXN. Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'étudier l'effet de la frataxine sur les vitesses de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU.

C . Etude des effets de la protéine FXN sur les réactions de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU

C . 1 . Effet de la protéine FXN sur la réduction du persulfure de NFS1

Les complexes NI et NIU ont tout d'abord été incubés en présence de FXN avec un excès de L-cystéine afin de générer à la fois un persulfure sur NFS1 et sur ISCU. Après élimination de la L-cystéine, la réduction du persulfure de NFS1 a été initiée par l'ajout de DTT (**Figure V. 10**).

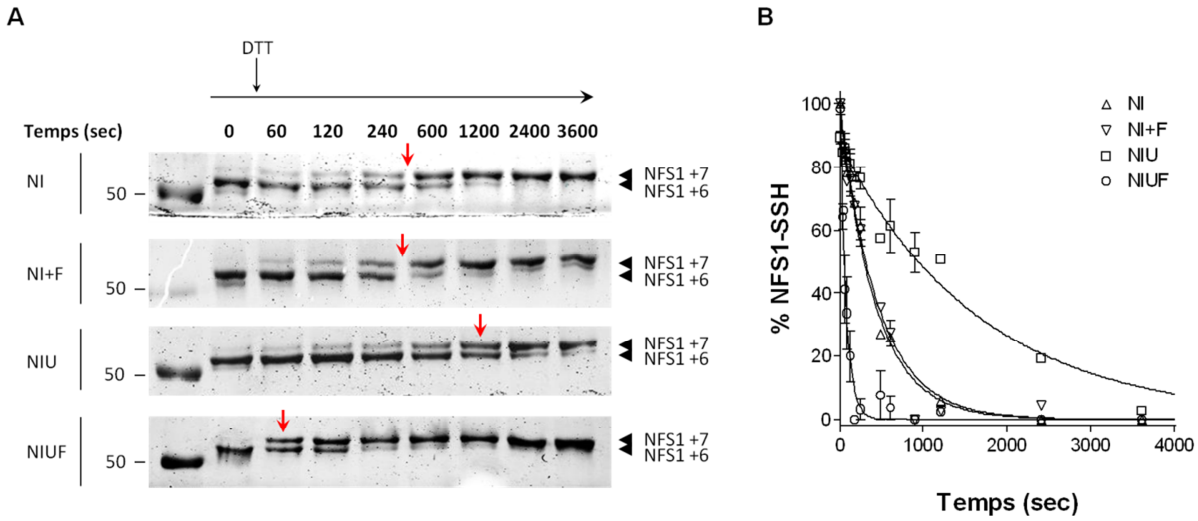


Figure V. 10. Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans le mélange NI+F et le complexe NIUF. A. SDS-PAGE 8 % des cinétiques de réduction des complexes NI et NIU (25µM), en présence ou non de FXN, avec 50 équivalents de DTT. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(3)** (Cf. page n° 191).

L'analyse SDS-PAGE montre que FXN accélère la réduction du persulfure de NFS1 en présence d'ISCU (complexe NIU), mais n'a aucun effet sur le complexe NI seul (**Figure V. 10**, **A**). Les gels ont été quantifiés et la réaction de réduction du persulfure de NFS1 est décrite par l'équation **(3)** (**Figure V. 10**, **B**, Cf. Chapitre IV). Nous avons déterminé des constantes de réduction du persulfure de NFS1, k_{R1}, pour les complexes NI et NIU, en présence de la protéine FXN, de 2,1 ± 0,1 $M^{-1}.s^{-1}$ et 13,0 ± 1,9 $M^{-1}.s^{-1}$, respectivement. La comparaison de ces valeurs avec celles obtenues pour les complexes NI et NIU seuls (respectivement de 2,0 ± 0,1 $M^{-1}.s^{-1}$ et 0,55 ± 0,05 $M^{-1}.s^{-1}$), montre que la protéine FXN active la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 d'un facteur 25 environ et uniquement en présence d'ISCU, mais n'a aucun effet sur le complexe NI.

Nous avions montré dans le chapitre précédent que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1, dans le complexe NIU, ne dépendait pas du niveau de persulfuration d'ISCU. Malheureusement, en présence de FXN la transpersulfuration étant très rapide, nous ne pouvons pas, avec notre protocole, étudié l'influence du niveau de persulfuration d'ISCU sur la vitesse de réduction du persulfure de NFS1.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la protéine FXN sur la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU.

C . 2 . Effets de la protéine FXN sur la réduction du persulfure d'ISCU

La réduction du persulfure d'ISCU par le DTT a été suivie en parallèle de la réduction du persulfure de NFS1 (**Figure V. 11**).

L'analyse SDS-PAGE montre que les vitesses de réduction des persulfures d'ISCU des complexes NIU et NIUF sont très similaires (**Figure V. 11**, **A**). Après la quantification des gels, nous avons modélisé les cinétiques en utilisant l'équation **(4),** correspondant à une réaction bimoléculaire (**Figure V. 11**, **B**, Cf. Chapitre IV). Nous avons obtenu une valeur de 0,29 ± 0,04 $M^{-1}.s^{-1}$ pour la constante de réduction du persulfure d'ISCU (k_{R2}) en présence de FXN ; ce qui n'est pas significativement différent de la valeur de 0,21 ± 0,04 $M^{-1}.s^{-1}$, obtenue précédemment en absence de FXN. Ces résultats indiquent que FXN n'a pas d'effet sur la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU.

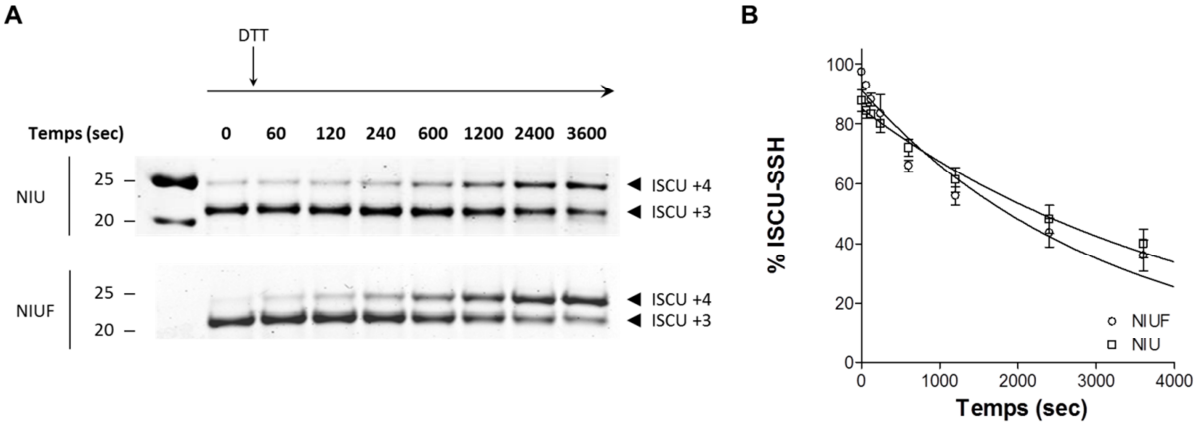


Figure V. 11. Etude de la réduction du persulfure d'ISCU dans le complexe NIUF. A. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de réduction du persulfure d'ISCU des complexes NIU et NIUF (25 µM) avec 50 équivalents de DTT. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(4)** (Cf. page n° 193).

Ainsi, nos résultats montrent que FXN stimule à la fois la réduction du persulfure de NFS1 et le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU, mais n'a aucun effet sur la réduction du persulfure d'ISCU (**Tableau V. 2**).

	NI	NI + F	NIU	NIUF
k_F (s-1)	> 0,23 ± 0,04	> 0,23 ± 0,02	> 0,26 ± 0,04	> 0,21 ± 0,01
k_T (s-1)	-	-	0,0018 ± 0,0004	> 0,10 ± 0,02
k_{R1} (M-1.s-1)	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,55 ± 0,05	13,0 ± 1,9
k_{R2} (M-1.s-1)	-	-	0,21 ± 0,04	0,29 ± 0,04

Tableau V. 2. Résumé des constantes de vitesse calculées.

Le test d'alkylation nous a permis d'étudier les cinétiques des réactions en cycle unique ; nous avons utilisé ces résultats pour analyser les réactions en cycles multiples afin de déterminer les réactions contrôlées par FXN dans ces conditions.

D . Etude de la réduction du persulfure de NFS1 par mesure de l'activité cystéine désulfurase en cycle multiple

Nous avons démontré, dans le chapitre précédent, que la réaction de réduction des persulfures, des complexes NI et NIU, est la réaction limitante dans des expériences en cycle multiple. Nous avons donc cherché à savoir si la réaction de réduction est toujours l'étape limitante lors de la mesure de l'activité cystéine désulfurase des complexes NI et NIU en présence de FXN. Pour cela, nous avons mesuré l'alanine générée par le mélange NI+F et le complexe NIUF (20 µM) pour des concentrations croissantes en DTT.

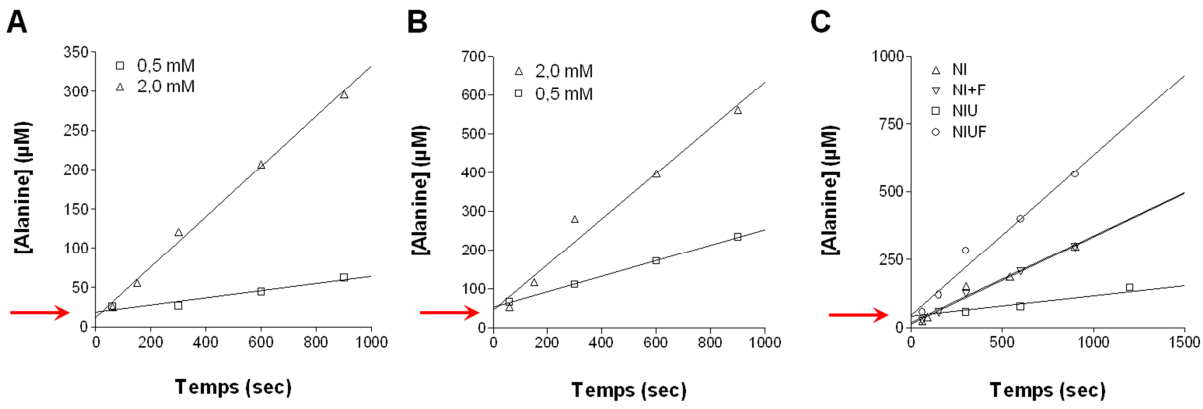


Figure V. 12. Alanine produite au cours du temps du mélange NI + F et du complexe NIUF. Les complexes NI (**A**) et NIU (**B**), avec FXN, sont en présence de 2 mM de L-cystéine et 500 µM ou 2 mM de DTT. **C.** Résumé des résultats obtenus pour NI, NI+F, NIU et NIUF. Les lignes noires représentent la simulation des régressions linéaires.

L'analyse des graphiques obtenus montre que l'activité cystéine désulfurase du mélange NI+F et du complexe NIUF augmente avec la concentration en DTT, ce qui indique effectivement que la réduction des persulfures (ISCU et/ou NFS1) est la réaction cinétiquement déterminante. De plus, comme nous l'avions déjà observé en absence de FXN, les simulations par régression linéaire des données expérimentales ne coupent pas l'axe des ordonnés par 0, ce qui est une indication supplémentaire que la réduction est l'étape limitante (Cf. Chapitre IV) (**Figure V. 12**, **A** et **B**). Ces résultats indiquent qu'en présence de FXN, la réduction des persulfures des complexes NI et NIU est également la réaction limitante par rapport à la vitesse de formation de ces persulfures.

Dans le chapitre IV, nous avons également démontré que l'activité cystéine désulfurase mesurée pour les complexe NI et NIU, ne reflète que la réduction du persulfure de NFS1. En présence de FXN, les constantes de vitesse de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU sont très différentes, avec une constante k_{R1} 25 fois plus grande que k_{R2} (**Tableau V. 2**) ; ce qui signifie que l'activité cystéine désulfurase du complexe NIUF mesurée reflète aussi uniquement la réaction de réduction du persulfure de NFS1.

Ainsi, en démontrant que la réduction du persulfure de NFS1 est l'étape limitante du cycle catalytique de l'enzyme, nos résultats montrent que la stimulation de l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU en présence de la protéine FXN est due à l'activation de la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 par FXN. Enfin, tout comme pour les complexes NI et NIU, les vitesses initiales du complexe NIUF sont linéaires jusqu'à 2 mM de L-cystéine ajoutés, ce qui indique que la réduction du persulfure de NFS1 est également un processus bimoléculaire (absence de site de fixation pour le réducteur) en présence de FXN (**Figure V. 13**, **A**) (Cf. **Annexe 20**). On retrouve également le phénomène d'inhibition de l'activité cystéine désulfurase de NFS1 pour de grand excès de L-cystéine (**Figure V. 13**, **B**).

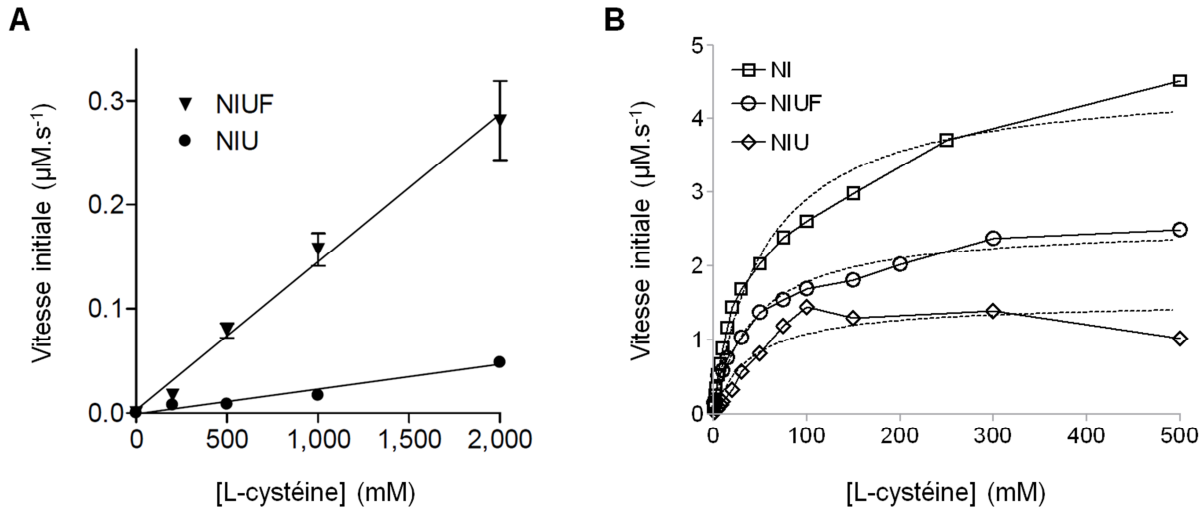


Figure V. 13. Réduction du persulfure de NFS1 du complexe NIUF par le L-cystéine. A et **B.** Les vitesses initiales des activités cystéine désulfurase ont été mesurées et calculées pour le complexe NIUF (20µM), avec des concentrations croissantes de L-cystéine. **A**. Les lignes noires représentent les régressions linéaires obtenues à partir de ces points. **B**. Les lignes continues correspondent à la reliure des points expérimentaux et les lignes en pointillé représentent les simulations des données expérimentales avec une équation du type Michaelis et Menten (Vitesse initiale = Vitesse max * [L-cys] / (K_M + [L-cys])).

Nous avons ensuite cherché à déterminer le mécanisme par lequel la frataxine est capable de stimuler à la fois le transfert de soufre vers ISCU et la réduction du persulfure de NFS1 par des réducteurs externes tels que le DTT.

E . Etude du mécanisme d'activation par la frataxine

E . 1 . Spécificité de la réduction par les réducteurs externes

Dans les paragraphes précédents, nous avons montré que FXN était capable d'activer la réduction du persulfure de NFS1 de manière similaire avec le DTT et la L-cystéine. Ces résultats suggèrent que l'activation par FXN n'est pas spécifique du réducteur. Nous avons donc testé différents réducteurs afin d'évaluer cette hypothèse. Outre, le DTT et la L-cystéine, nous avons testé deux autres réducteurs à thiol, le glutathion (GSH) et le β-mercaptoéthanol (β-ME), et un réducteur non-thiol, le tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP). Les constantes de vitesse k_{R1} de réduction du persulfure de NFS1 ont été mesurées pour les complexes NIU et NIUF (25 µM) à l'aide du test d'alkylation (sauf pour la L-cystéine) (**Figure V. 14**).

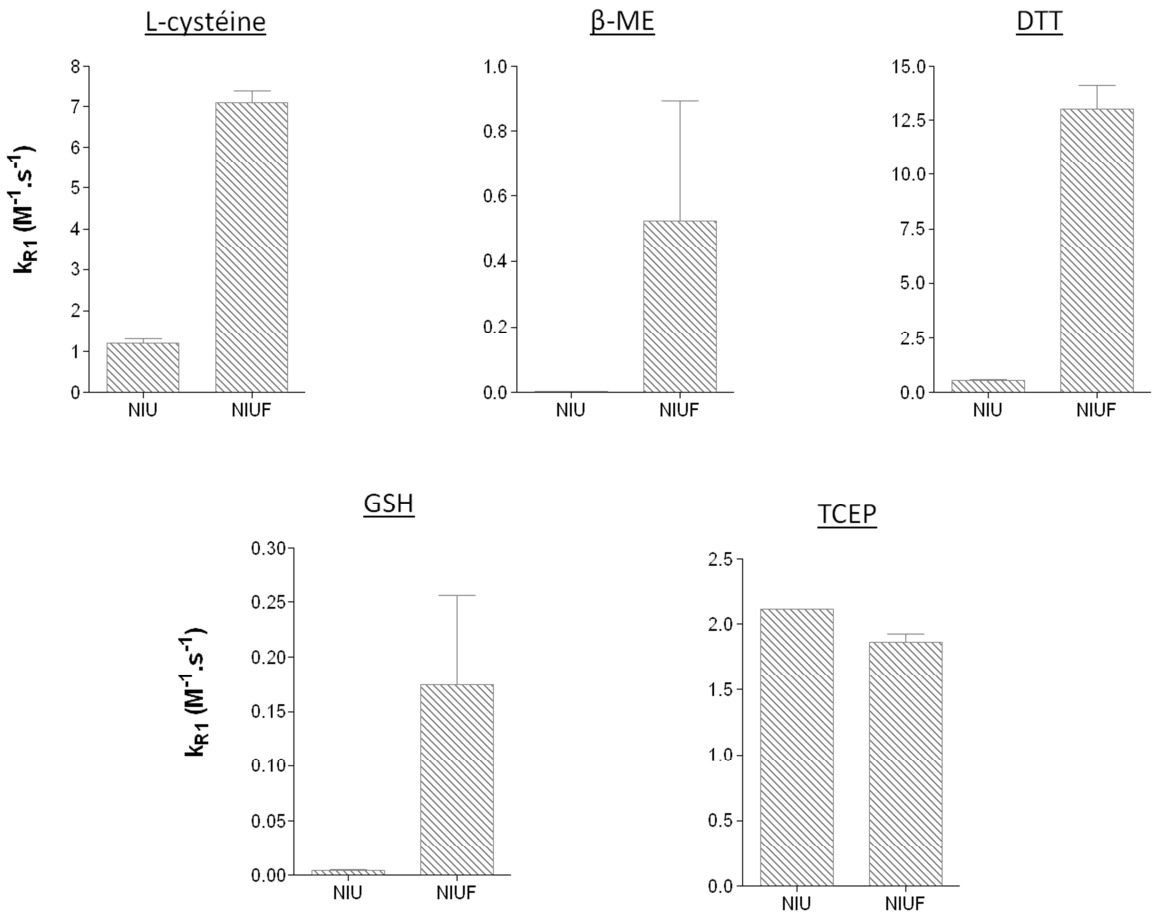


Figure V. 14. Comparaison des constantes de vitesse k_{R1} déterminées pour les complexes NIU et NIUF, incubés avec différents réducteurs. Les cinétiques de réduction du persulfure de NFS1 des complexes NIU et NIUF (25µM) ont été réalisées avec 50 équivalents de L-cystéine, β-ME, DTT, GSH ou de TCEP.

L'analyse des résultats montre que tous les réducteurs à thiols ainsi que le TCEP sont capable de réduire le persulfure de NFS1. Cependant, FXN ne semble pas capable d'activer cette réaction avec le TCEP, alors que la réduction du persulfure de NFS1 est stimulée avec tous les réducteurs à thiols (L-cystéine, β-ME, GSH et DTT). Cet effet différentiel entre réducteur à thiol et non-thiol pourrait être dû à l'encombrement stérique de ces molécules pour accéder au persulfure de NFS1. Cependant, la masse moléculaire du TCEP se situe entre celle du DTT et du GSH (**Tableau V. 3**). L'absence d'activation par la protéine FXN avec le TCEP ne semble donc pas liée à des différences d'encombrement stérique. De même, il ne semble pas existé de corrélation entre la taille des réducteurs à thiol et leur efficacité respective.

	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	k_{R1} ($M^{-1}.s^{-1}$)
β-ME	78,73	0,16
L-cystéine	121,16	7,1
DTT	154,25	12
TCEP	286,65	1,86
GSH	307,32	0,1

Tableau V. 3. Résumé des constantes de vitesse k_{R1} déterminées pour le complexe NIUF, pour différents réducteurs.

E . 2 . Etude des activités persulfure réductase de FDX2 et GLRX5

Nous avons également testé deux protéines, FDX2 et GLRX5, deux candidats réductases impliqués dans la biogenèse des centres Fe/S. La ferrédoxine (ou FDX2) a été proposée comme réductase du persulfure de NFS1, grâce à son centre [2Fe-2S], capable de transférer des électrons (Kim *et al.* 2013; Yan *et al.* 2013). Nous avons donc étudié la réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU du complexe NIUF en présence de FDX2, avec ou sans ions Fe^{2+} (**Figure V. 15**). L'analyse SDS-PAGE, obtenue après l'alkylation des protéines avec le $MalP_{16}$, ne montre aucune variation de la quantité d'ISCU et de NFS1 persulfurée après 15 minutes d'incubation. Nous avons également étudié la réaction de réduction avec la forme apo de la glutarédoxine 5 (ou GLRX5), qui fait partie de la famille des glutarédoxine monothiol. A la différence des glutarédoxines dithiols, les monothiols ne semblent pas posséder d'activité oxydoréductase pour la réduction des ponts disulfures, mais à notre connaissance la réduction de persulfure n'avait jamais été testée. De même, les gels obtenus ne montrent aucune évolution des bandes « ISCU +3 » et « NFS1 +6 », ce qui indique que ni le persulfure d'ISCU ni celui de NFS1 ne sont réduits par GLRX5 dans nos conditions (**Figure V. 15**).

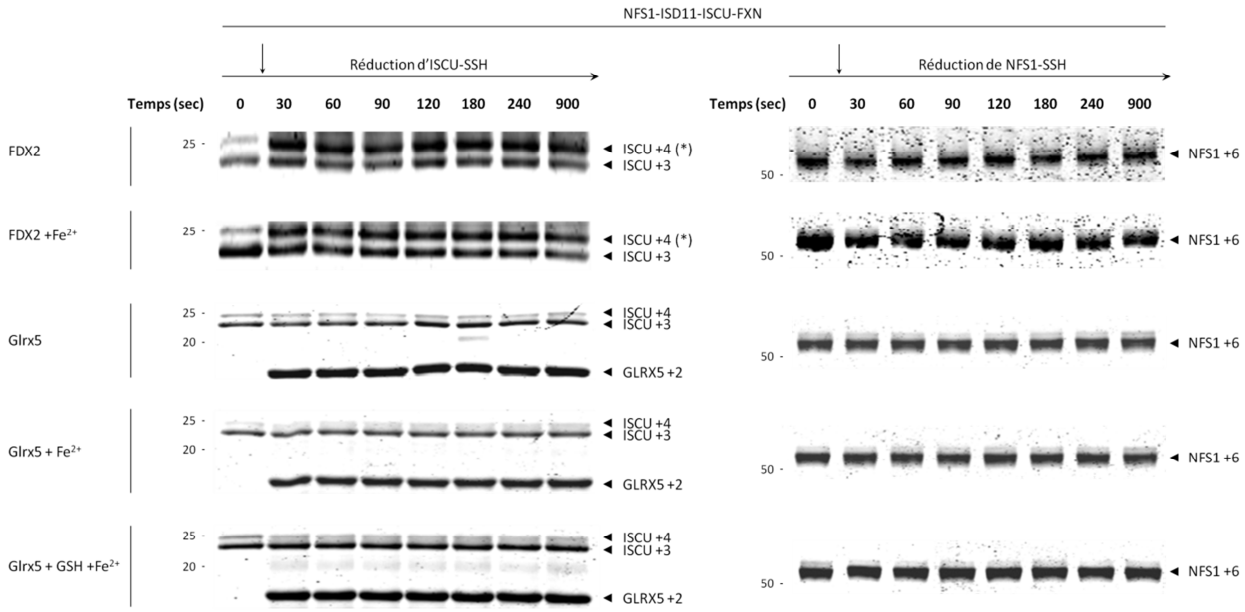


Figure V. 15. Réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU par les protéines FDX2 et GLRX5. Le complexe NIUF (20 µM) a été préalablement incubé avec 10 équivalents de L-cystéine pendant 3 minutes. Après désalage de l'échantillon, la réduction est initiée avec 1,2 équivalent de FDX2, préalablement réduite avec du dithionite, en présence ou non de 5 équivalents de Fe^{2+} ; ou bien avec 1,5 équivalents de GLRX5, en présence ou non de 5 équivalents de Fe^{2+} et 60 équivalents de GSH. L'indication « ISCU +4 (*) » correspond à FDX2 avec 4 cystéines alkylées par le $MalP_{16}$, qui co-migre avec « ISCU +4 ». Ainsi, la quantification des formes persulfurées d'ISCU se fait grâce à la bande « ISCU +3 ». L'annotation « GLRX5 +2 » représente la protéine GLRX5 avec ses deux cystéines alkylées par le $MalP_{16}$.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que l'activation par la protéine FXN est spécifique des réducteurs à thiol. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la frataxine stimule également la transpersulfuration, qui peut formellement s'écrire comme une réduction du persulfure de NFS1 par l'une des cystéines d'ISCU. De plus, l'absence de corrélation entre la taille des réducteurs indique que la réduction n'est pas limitée par la diffusion des réducteurs externes vers le persulfure de NFS1 ; et donc que FXN n'influence pas cette étape. Si FXN ne favorise pas l'accès au persulfure de NFS1, il est possible qu'elle active directement la réaction de réduction en jouant sur l'état de transition, notamment par déprotonation du thiol nucléophile ; car il est connu que dans la famille des oxydoréductases à thiols, la déprotonation active significativement la réaction, la forme protonée étant beaucoup plus lente que la forme thiolate.

E . 3 . Etude du mutant R162A de FXN

Nous avons donc cherché un acide aminé basique dans la structure de FXN susceptible de réaliser cette réaction. Nous avons identifié l'arginine R162, car c'est un acide aminé

basique orientée vers l'extérieur de la protéine et stabilisé dans cette position via une interaction « π-cation » avec le tryptophane W152 (Cf. la **Figure I. 19** du Chapitre I). Sachant que le mutation du tryptophane W152 entraine une perte de l'interaction entre FXN et le complexe NIU, nous avons testé le mutant R162A de FXN. Nous avons également étudié le mutant M106I d'ISCU, dont l'homologue levure (M107I d'Isu1) semble reproduire partiellement l'effet activateur de la frataxine sur l'assemblage des centres Fe/S. Ce mutant pourrait également nous permettre d'identifier la ou les réaction(s) essentielle(s) pour l'assemblage des centres Fe/S entre la réduction par les thiols externes et la transpersulfuration.

Nous avons étudié le comportement du mutant R162A de FXN lors du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU.

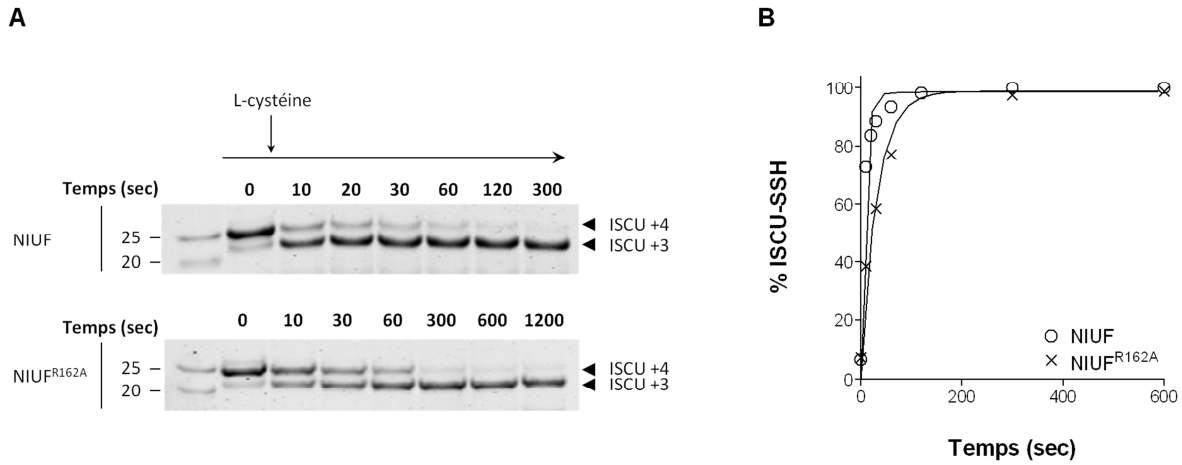


Figure V. 16. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans le complexe NIUF^{R162A}. A. SDS-PAGE 14 % de la cinétique de formation du persulfure sur ISCU des complexes NIUF^{R162A} et NIUF (25 µM) en présence de 20 équivalents de L-cystéine. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(2)** (Cf. page n° 184).

Nous avons constaté que le mutant R162A de FXN active le transfert de soufre vers ISCU mais moins rapidement que la protéine sauvage, ce qui suggère que la mutation R162A altère l'activation du transfert par FXN (**Figure V. 16**, **A**). La quantification du gel et la simulation des données expérimentales avec l'équation **(2)** indiquent que la constante de vitesse, k_T, calculée est de 0,032 ± 0,003 s^{-1} ; soit une valeur trois fois plus petite que la constante k_T obtenue avec la protéine sauvage (0,10 ± 0,02 s^{-1}) (**Figure V. 16**, **B**). Bien que l'effet de la mutation soit modéré, ces résultats suggèrent que l'arginine R162 participe à l'activation du transfert.

F . Etude du mutant M106I d'ISCU : un homologue fonctionnel de FXN ?

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'équipe de A. Dancis et D. Pain a montré que le mutant M107I d'Isu1 est capable de complémenter une souche de levure délétée pour le gène *yfh1* en restaurant partiellement la synthèse *de novo* de centres Fe/S (Yoon *et al.* 2012; Pandey *et al.* 2013; Yoon *et al.* 2014). Nous nous sommes alors demandé si le transfert et/ou la réduction du persulfure de NFS1 sont stimulés par le mutant M106I d'ISCU de souris correspondant au mutant M107I d'Isu1 de levure.

F . 1 . Etude de la réduction du persulfure de NFS1

Nous avons étudié la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 par le DTT par des expériences d'alkylation par le $MalP_{16}$ du complexe NIU^{M106I}, préalablement persulfuré en présence de L-cystéine.

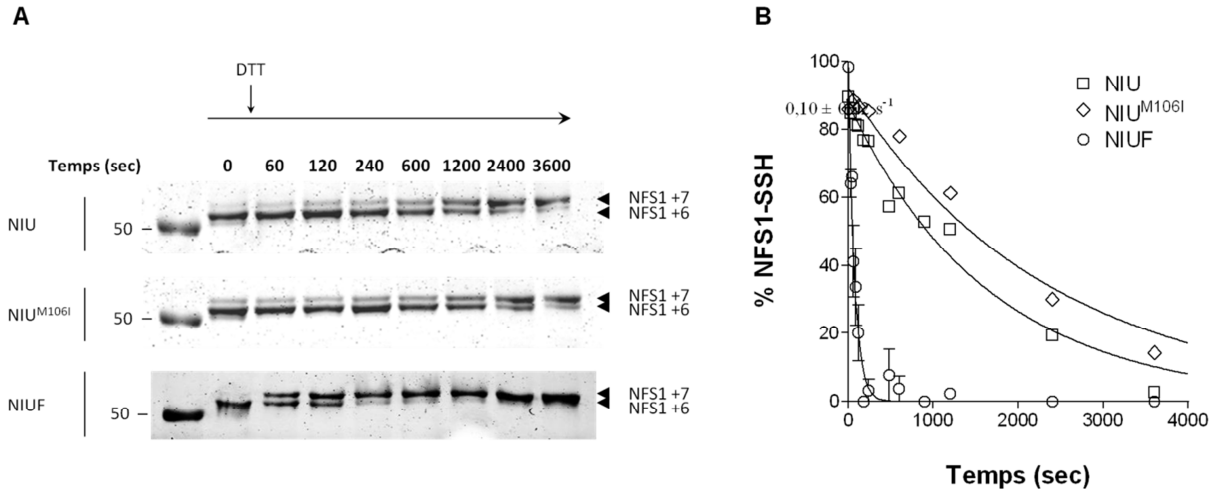


Figure V. 17. Etude de la réduction du persulfure de NFS1 dans le complexe NIU^{M106I}. A. SDS-PAGE 8 % des cinétiques de réduction du persulfure de NFS1 des complexes NIU, NIU^{M106I} et NIUF (25 µM) avec 50 équivalents de DTT. **B**. Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(3)** (Cf.page n° 191).

L'analyse SDS-PAGE montre que la cinétique de réduction du persulfure de NFS1 n'est pas stimulée avec le mutant M106I d'ISCU par rapport à la protéine sauvage (**Figure V. 17**, **A**). La quantification des gels et la simulation des données expérimentales nous indiquent que la constante de vitesse, k_{R1}, calculée pour le complexe NIU^{M106I} est de $0{,}38 \pm 0{,}04\ M^{-1}.s^{-1}$

(**Figure V. 17**, **B**). Cette valeur est légèrement plus faible que celle obtenue pour le complexe NIU d'un facteur 1,5 environ (0,55 ± 0,05 $M^{-1}.s^{-1}$, **Tableau V. 2**). Ces résultats indiquent donc que la mutation M106I n'active pas intrinsèquement la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 ; il semble même qu'elle ralentisse cette réaction.

F . 2 . Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU^{M106I}

Nous avons ensuite étudié l'effet de la mutation M106I d'ISCU sur le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU^{M106I} à l'aide du test d'alkylation.

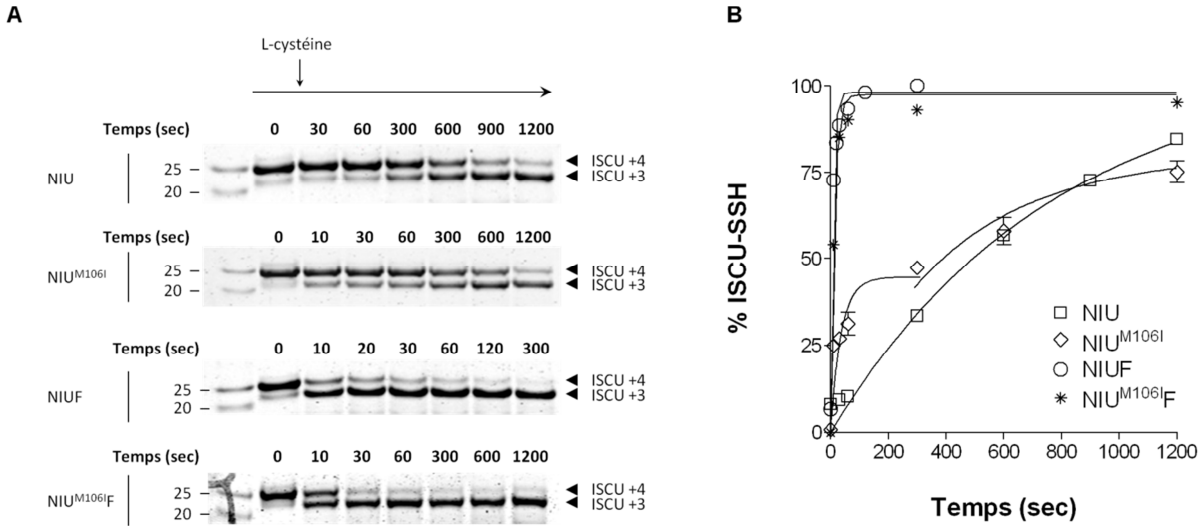


Figure V. 18. Etude du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU dans les complexes NIU^{M106I} et NIU^{M106I}F. A. SDS-PAGE 14 % des cinétiques de formation du persulfure d'ISCU des complexes NIU, NIU^{M106I}, NIUF, NIU^{M106}F (25µM) en présence de 20 équivalents de L-cystéine. **B**. Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(2)** (Cf. page n°184).

L'analyse SDS-PAGE montre que les cinétiques de transfert de soufre sont en apparence très similaires entre le mutant M106I d'ISCU et la protéine sauvage, que ce soit en absence ou présence de FXN (**Figure V. 18**, **A**). Cependant, après la quantification des gels, nous avons observé que la quantité de persulfures formés sur ISCU dans les 5 premières minutes de la réaction est plus importante avec le mutant M106I et en absence de FXN uniquement. Etonnement, après 5 minutes, les cinétiques de transfert de soufre des complexes NIU et NIU^{M106I} sont très similaires. Nous avons alors tenté d'estimer des constantes de vitesse de transfert de soufre du complexe NIU^{M106I} pour les parties de cinétique avant et après 5 min. Nous avons obtenu des constantes de vitesses, k_T, de 0,027 ± 0,007 s^{-1} entre 0 et 5 min et 0,0025 ± 0,0003 s^{-1}, entre 5 min et 20 minutes de réaction (**Figure V. 18**, **B**). La

valeur déterminée pour les 5 premières minutes correspond à une valeur intermédiaire à celles déterminées pour les protéines sauvages, avec et sans FXN (0,0018 ± 0,0004 s^{-1} et 0,10 ± 0,02 s^{-1}). En présence de FXN, nous avons déterminé des constantes de vitesses quasiment identiques pour le mutant M106I en comparaison de la protéine sauvage (0,076 ± 0,007 s^{-1} et 0,10 ± 0,02 s^{-1} respectivement ; **Figure V. 18**, **B**).

Nous venons de voir que, contrairement à la frataxine, le mutant M106I d'ISCU n'a pas effet activateur sur les vitesses de réduction du persulfure de NFS1 mais présente un effet stimulateur sur le transfert de soufre sur ISCU. Nous avons également cherché à déterminer si la mutation M106I d'ISCU influence la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU.

F . 3 . Etude de la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU^{M106I}

Par des expériences d'alkylation, nous avons cherché à déterminer si le mutant M106I d'ISCU pouvait avoir un effet stimulateur sur la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU.

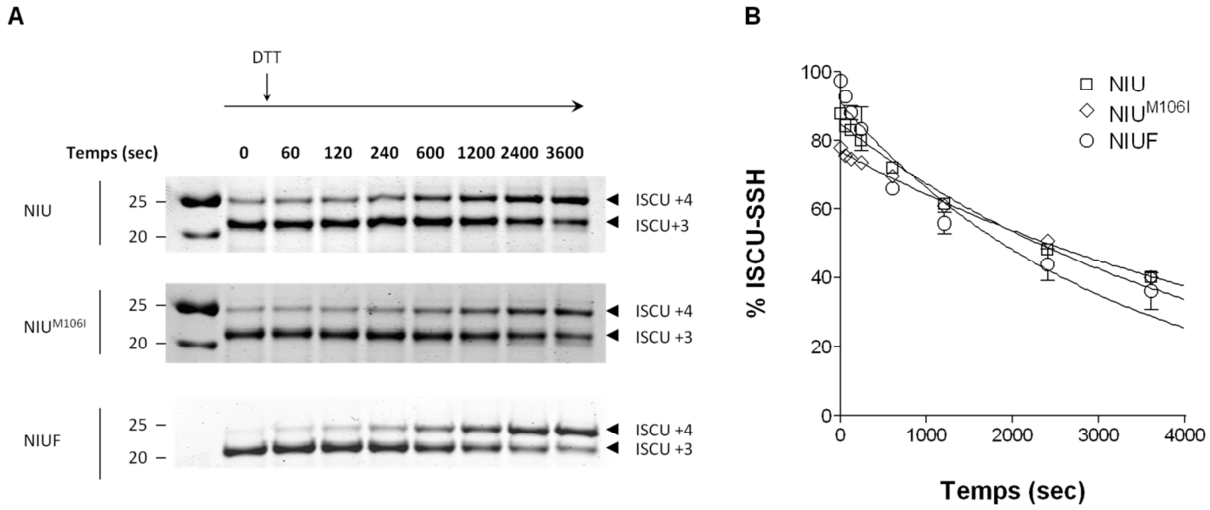


Figure V. 19. Etude de la réduction du persulfure d'ISCU dans le complexe NIU^{M106I}. A. SDS-PAGE 14 % des cinétiques de réduction du persulfure d'ISCU des complexes NIU, NIU^{M106I} et NIUF (25 µM) avec 50 équivalents de DTT. **B.** Quantification des gels SDS-PAGE en **A**. Les lignes noires représentent les courbes simulées avec l'équation **(4)** (Cf. page n° 193).

L'analyse SDS-PAGE montre que le mutant M106I n'a pas d'influence sur les vitesses de réduction du persulfure d'ISCU. Ces résultats sont confirmés par l'analyse quantitative montrant que les constantes de réduction ne sont pas significativement différentes, avec un constante k_{R2} de 0,161 ± 0,004 $M^{-1}.s^{-1}$ pour le complexe NIU^{M106I}. L'ensemble de ces résultats

montre que le mutant M106I d'ISCU n'active pas la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU.

Ainsi, les résultats obtenus sur l'étude du mutant M106I d'ISCU sont contraires à ce qu'il a été publié par l'équipe de Dancis (Pandey *et al.* 2013), qui affirme démontrer que la frataxine et le mutant M107I d'Isu1 agissent sur la vitesse de formation du persulfure de NFS1. Une de leurs expériences montre que la protéine Nfs1 lie difficilement son substrat, ce qui signifie que l'enzyme aurait une faible affinité pour son substrat ; or nos résultats sur la vitesse de formation du persulfure sur NFS1 nous indiquent que l'affinité de la L-cystéine pour NFS1 doit être élevée pour former un persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1 en quelques secondes. Cette différence d'activité entre ces cystéines désulfurases de mammifère et de levure pourrait expliquer la différence de résultats ; c'est-à-dire, que si les protéines Nfs1 et NFS1 n'ont pas la même affinité pour leur substrat, les réactions et les observations seront forcément différentes.

G . Discussion - Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons confirmé que la frataxine stimule l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1-ISD11 et ceci uniquement en présence de la protéine ISCU. A l'aide du test d'alkylation par le $MalP_{16}$ et des analyses par spectrométrie de masse en protéine entière, nous sommes parvenus à montrer que la frataxine stimule la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 par le DTT ainsi que la vitesse de transfert de soufre entre NFS1 et ISCU. Etant donné que les vitesses de formation du persulfure de NFS1 sont trop rapides pour être résolues avec notre test d'alkylation (réaction complète en une dizaine de secondes), nous n'avons pas pu déterminer si FXN stimule ou non cette réaction comme proposé par les équipes de D. Barondeau et A. Dancis/D. Pain. Nous avons ensuite analysé les cinétiques en cycle multiple et nous avons observé un mécanisme similaire à celui décrit dans le Chapitre IV ; i) la réduction du persulfure de NFS1 est la réaction limitante du cycle catalytique en absence et en présence de FXN et ii) le persulfure d'ISCU ne contribue pas à la production globale d'ions sulfures. Bien que nous ne puissions pas déterminer si FXN stimule également la formation du persulfure sur NFS1 avec le test d'alkylation, si tel était le cas cela n'aurait aucune influence sur les vitesses globales de production d'ions sulfures puisque que

la formation du persulfure sur NFS1 n'est pas la réaction limitante du cycle catalytique de l'enzyme.

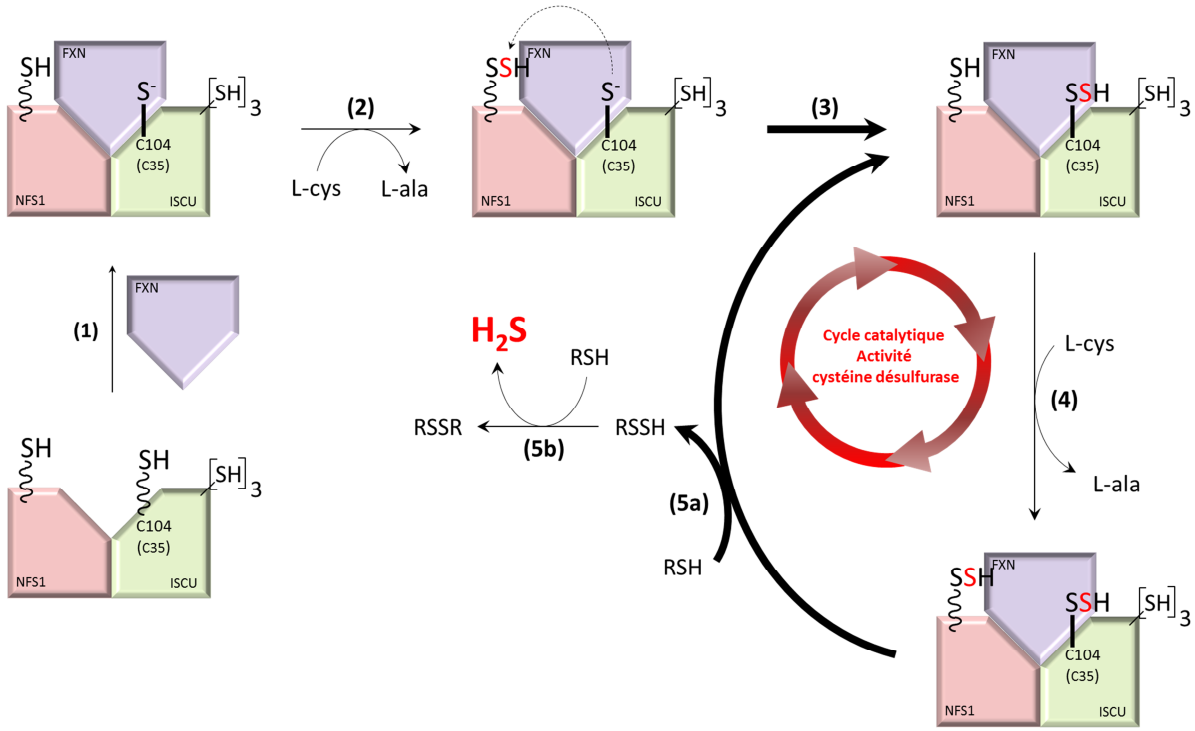


Figure V. 20. Schéma proposé du mécanisme d'action de la frataxine sur le complexe NIU. Les protéines NFS1, ISCU et FXN sont représentées de manière schématique, avec la cystéine catalytique de NFS1 et les quatre cystéines d'ISCU. **(1)** Formation du complexe quaternaire. **(2)** Formation du persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1. Nous avons démontré que cette réaction ne nécessite ni la présence d'ISCU ni celle de FXN. **(3)** Transfert de soufre entre NFS1 et ISCU. La flèche en pointillé représente l'attaque nucléophile d'une des cystéines d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure de NFS1. Selon nos résultats et nos hypothèses, la cystéine d'ISCU est probablement sous la forme d'un thiolate, ce qui a pour effet d'accélérer la réaction. Un positionnement optimal des cystéines d'ISCU et de NFS1 pourrait également expliquer cette activation du transfert de soufre. **(4)** Formation d'un second persulfure sur la cystéine catalytique de NFS1. Le complexe est maintenant doublement persulfuré. **(5)** Réduction du persulfure de NFS1, qui contribue seul à la formation des ions sulfures. (**5a**) Transfert de soufre de NFS1 vers un réducteur à thiol (RSH), entrainant la formation d'un persulfure sur ce réducteur à thiol (RSSH). (**5b**) Libération des ions sulfures par réduction de l'espèce RSSH par une seconde molécule de réducteur à thiol. Cette réaction est intra-moléculaire lorsque le DTT est utilisé comme réducteur.

Etonnamment, l'étude du mutant M106I, qui dans la levure est capable de contourner le rôle de la frataxine *in vivo* en restaurant partiellement la biogenèse des centres Fe/S, semble indiquer, que c'est le transfert, et non pas la réduction de NFS1 qui est stimulée par cette mutation. Ces résultats suggèrent donc que la persulfuration d'ISCU est une étape clé pour l'assemblage de centres Fe/S en conditions physiologiques.

Nous avons également montré que la réaction de transpersulfuration est une réaction directe entre la cystéine C383 persulfurée de NFS1 et l'une des cystéines d'ISCU. De même qu'en absence de FXN, nous avons constaté que la cystéine C104 est la cystéine majoritairement persulfurée et qu'une quantité beaucoup plus faible de persulfure est trouvée

sur la cystéine C35. Ces résultats montrent donc que l'activation par FXN ne modifie pas le mécanisme global du processus de transfert mais accélère cette réaction. Deuxièmement, ces résultats confirment que C35 est une cible de la transpersulfuration et pourrait donc jouer un rôle dans l'assemblage des centres Fe/S.

Ces résultats posent la question du mécanisme par lequel la frataxine active ces deux réactions. Formellement le transfert peut être décrit comme une attaque nucléophile d'une des cystéines d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure (soufre en β du carbone) ; et non pas sur le soufre en α du persulfure car cela aurait conduit à la formation d'un pont disulfure inter-moléculaire entre NFS1 et ISCU ; or nous n'avons pas détecté la formation d'une telle espèce en conditions non réductrices, et surtout ISCU n'aurait pas été persulfurée par ce mécanisme. De même, pour la réduction du persulfure de NFS1 par les composés à thiol, les tests d'alkylation au $MalP_{16}$ ne montrent pas de présence d'adduit DTT sur NFS1 par pont disulfure mixte entre sa cystéine catalytique et le DTT. Le transfert et la réaction de réduction correspondent donc à même type de réaction biochimique consistant en une attaque nucléophile du soufre d'une des cystéines d'ISCU, dans un cas, et d'une des fonctions thiols du DTT, dans l'autre cas, sur le soufre terminal du persulfure de NFS1 ; conduisant à la persulfuration d'ISCU et à du DTT persulfuré (**Figure V. 20**, réaction **5a**). Notre hypothèse est donc que l'activation du transfert et de la réduction du persulfure de NFS1 par la frataxine passe par un même mécanisme. Cette hypothèse est de plus confortée par notre étude comparative de différents réducteurs, certes limitée à moins d'une dizaine de composés et d'enzymes, qui suggère tout de même que l'activation par FXN de la réduction du persulfure de NFS1 est spécifique des composés à thiol de petite taille. Les expériences réalisées avec les protéines FDX2 et GLRX5 n'ont pas permis de mettre en évidence une activité persulfure réductase de ces enzymes ; cependant, nous pouvons tout à fait imaginer que nos conditions ne sont pas optimales pour observer ce phénomène.

Enfin, l'analyse cinétique en régime stationnaire, montre que la réduction est un processus bimoléculaire. Au moins deux paramètres peuvent contrôler ce type de réaction : la diffusion des réactifs les uns vers les autres et l'état de transition de la réaction. L'étude avec les différents réducteurs semble indiquer que la réaction n'est pas contrôlée par la diffusion, car il n'y a pas de corrélation entre la taille des réducteurs et leur efficacité. De plus, l'étude du mutant R162A suggère que FXN active la réaction par déprotonnation du thiol nucléophile (Cystéine d'ISCU ou réducteur externe). Un autre mécanisme pourrait également être avancé.

La frataxine pourrait directement agir sur le persulfure de NFS1 en positionnant celui-ci afin de favoriser la réaction de transfert de soufre, car l'efficacité de ce type de réaction qui s'apparente aux réactions d'échange thiol/disulfure dépend de l'orientation de la liaison S-S par rapport au thiol nucléophile. Cependant cela aurait potentiellement pour effet de diminuer la mobilité de la boucle portant la cystéine catalytique C383. De plus, nous aurions dû observer une activation avec le TCEP dans ce cas. Bien que d'autres études soient nécessaires pour définitivement établir le mécanisme d'activation par la frataxine, notre modèle actuel sur la base de nos résultats, est que la frataxine active à la fois le transfert de soufre majoritairement vers la cystéine C104 d'ISCU et le transfert de soufre vers de petites molécules à thiol, en favorisant la forme thiolate du réducteur.

Chapitre VI

Etude des mécanismes de formation d’un centre Fe/S sur la protéine ISCU

Chapitre VI. Etudes des mécanismes de formation d'un centre Fe/S sur la protéine ISCU

Lors des chapitres précédents, nous avons observé la formation de deux persulfures, l'un sur NFS1 et l'autre sur ISCU, mais seul le persulfure de NFS1 semble contribuer à la production d'ions sulfures lorsqu'un thiol est utilisé comme réducteur. Nous avons donc cherché à déterminer le comportement des persulfures de NFS1 et d'ISCU en conditions de reconstitution de centres Fe/S.

A . Reconstitution d'un centre Fe/S *in vitro* sur la protéine ISCU

A . 1 . Reconstitution Fe/S en présence de DTT

Bien que nous ayons montré précédemment (Cf. Chapitre IV et V) que la L-cystéine substrat de NFS1 pouvait également réduire le persulfure de NFS1, nous avons tout d'abord étudié la reconstitution de centres Fe/S dans des conditions proches de celles utilisées par les équipes de D. Barondeau et de H. Puccio, c'est-à-dire en présence de DTT (Tsai *et al.* 2010; Colin *et al.* 2013).

Les expériences de reconstitution Fe/S sont réalisées sous atmosphère contrôlée en boite à gant (BAG), et la cinétique de formation des centres Fe/S est suivi parallèlement par spectroscopie UV-visible et par alkylation au $MalP_{16}$. Les complexes NIU et NIUF ont été préalablement incubés avec le fer et le DTT et la réaction a été initiée par l'ajout de L-cystéine. Les résultats obtenus par spectroscopie UV-visible sont présentés dans la **Figure VI. 1** et ceux obtenus par alkylation au $MalP_{16}$ sont dans la **Figure VI. 2**.

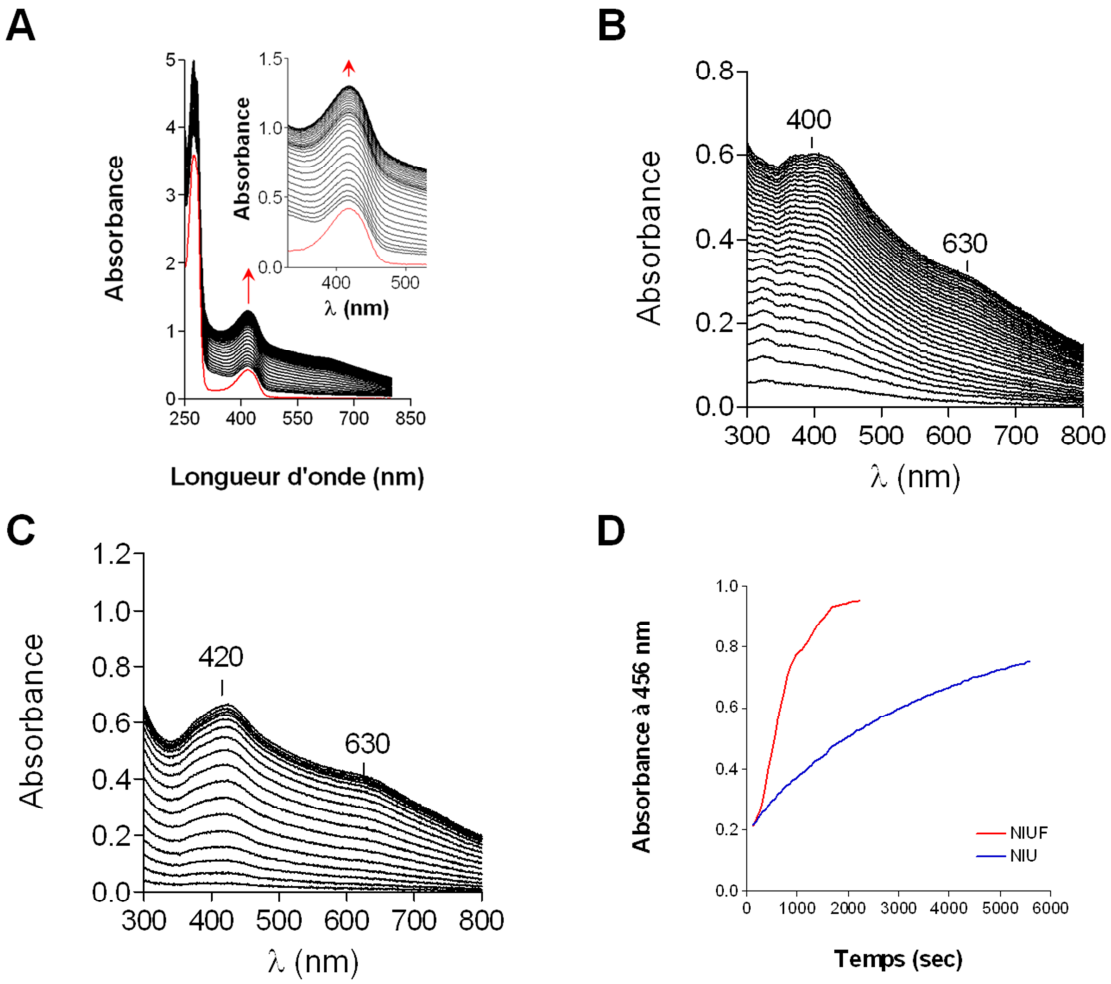


Figure VI. 1. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en présence de DTT, suivi par UV-visible. A. Exemple d'une série de spectres brutes obtenus lors du suivi par UV-visible de la reconstitution Fe/S sur ISCU dans le complexe NIUF (50 µM), en présence de 4 équivalents d'ions Fe^{2+} et 30 équivalents de DTT et de L-cystéine. Les flèches rouges indiquent le sens de progression observé d'un spectre à l'autre. **B** et **C**. Spectres de différences entre les formes « apo » des protéines et les spectres UV-visible obtenus au cours de la reconstitution Fe/S des complexes NIU (**B**) et NIUF (**C**) **D.** Cinétiques de reconstitution Fe/S obtenues grâce au suivi de l'absorbance à 456 nm.

Les spectres UV-visible du mélange contenant NFS1, ISCU avec ou sans FXN (spectre rouge de la **Figure VI. 1** (**A**)) montre deux pics majoritaires, l'un vers 280 nm correspondant à l'absorbance des protéines ; et l'autre pic, vers 420 nm correspondant à l'absorption du PLP, cofacteur de NFS1. Lors de l'ajout du fer, du DTT et de la L-cystéine, on distingue que le premier spectre, enregistré environ deux minutes et trente secondes après le début de la réaction, est déjà très différent du spectre initial. Les spectres de différences montrent tout d'abord une augmentation de l'absorbance vers 320 - 350 nm, qui correspond probablement à l'absorption du fer, qui sous une forme oxydée (Fe^{3+}), donne une bande d'absorption large vers 320 nm (Tucker *et al.* 2008) et potentiellement aussi due à la formation du persulfure sur NFS1 (Behshad *et al.* 2009).

L'absorption augmente ensuite sur quasiment l'ensemble des longueurs d'onde de manière régulière. En absence de FXN, les spectres de différence montrent une absorption très large centrée sur 400 nm qui est caractéristique des centres [4Fe-4S] ; les centres [2Fe-2S] étant généralement caractérisés par des maximums d'absorption vers 320 nm, 400 nm, 450 nm et 500 nm (**Figure VI. 1 (B)**) (Iannuzzi *et al.* 2011). En présence de FXN, les spectres sont très similaires avec une absorption très large centrée sur 400 nm, et des maximas d'absorption sont également visibles vers 420 nm, indiquant la présence de centres [4Fe-4S] (**Figure VI. 1 (C)**). Cependant, l'étude réalisée par spectroscopie Mössbauer par l'équipe de S. Ollagnier a permis de démontrer qu'une certaine quantité de centres [2Fe-2S] est également formé, et que la proportion de centres [4Fe-4S] augmente en présence de FXN (Colin et al. 2013). L'absorption des centres [2Fe-2S] étant moins intense que celle des centres [4Fe-4S], c'est probablement la raison pour laquelle nous n'avons pas observé de signature caractéristique des centres [2Fe-2S] dans nos spectres UV-visible.

Afin de suivre la cinétique de reconstitution des centres Fe/S, nous nous sommes placés vers 460 nm (**Figure VI. 1 (D)**). On constate que FXN stimule la biogenèse des centres Fe/S comme ce qui avait été observé par les équipes de D. Barondeau et H. Puccio.

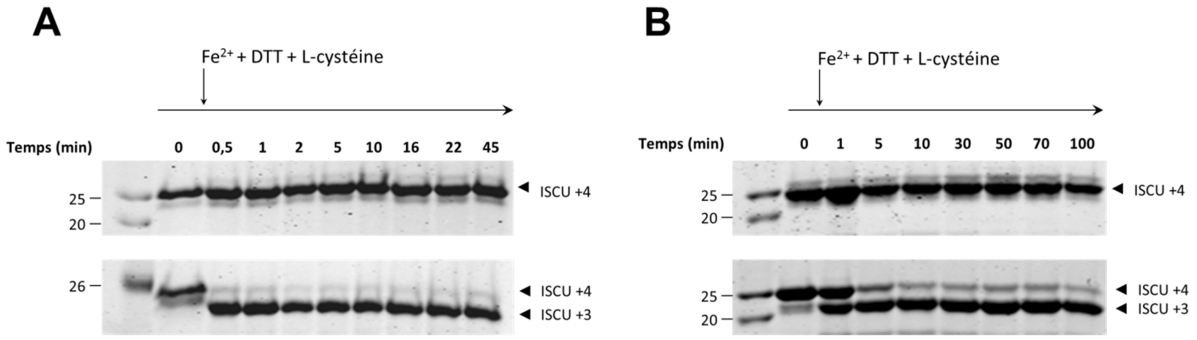


Figure VI. 2. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en présence de DTT, suivi par alkylation au $MalP_{16}$. Gels SDS-PAGE 14% en conditions non réductrices (haut) et réductrices (bas) des complexes NIU (**A**) et NIUF (**B**) (50 µM), incubés avec 4 équivalents de fer et 30 équivalents de DTT et de L-cystéine.

Le suivi de la persulfuration d'ISCU montre que ce persulfure se forme très rapidement au cours de la réaction et que sa formation n'est pas corrélée à la formation des centres Fe/S ; et ceci aussi bien en présence qu'en absence de FXN. De plus, ce persulfure n'empêche pas l'assemblage de centres Fe/S contrairement à ce qui avait été avancé par le groupe de J. Cowan avec la protéine IscU bactérienne (Nuth *et al.* 2002). Enfin, au terme de la reconstitution, le persulfure d'ISCU est toujours présent, ce qui suggère fortement qu'il n'est pas réduit au cours de cette réaction. Ces résultats préliminaires indiquent que le persulfure

d'ISCU ne semble pas être incorporé aux centres Fe/S formés sur ISCU et que les ions sulfures provient donc uniquement de la protéine NFS1.

Nous avons ensuite étudié la reconstitution des centres Fe/S en absence de DTT avec uniquement du fer et de la L-cystéine.

A . 2 . Reconstitution Fe/S avec la L-cystéine comme réducteur

La reconstitution des centres Fe/S a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment mais en absence de DTT.

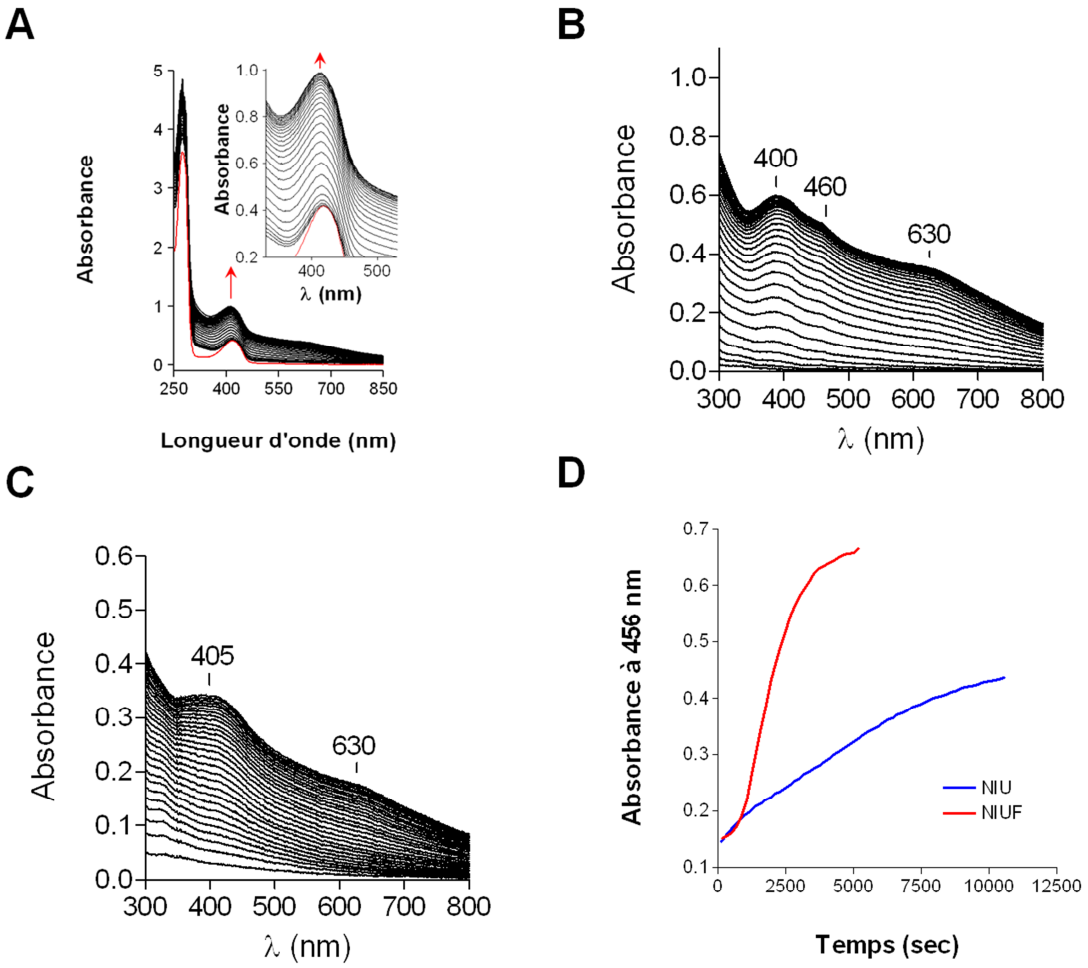


Figure VI. 3. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en absence de DTT, suivi par UV-visible. A. Exemple d'une série de spectres brutes obtenus lors du suivi par UV-visible de la reconstitution Fe/S sur ISCU dans le complexe NIUF (50 µM), en présence de 4 équivalents d'ions Fe^{2+} et 30 équivalents de L-cystéine. Les flèches rouges indiquent le sens de progression observé d'un spectre à l'autre. **B** et **C**. Spectres de différences entre les formes « apo » des protéines et les spectres UV-visible obtenus au cours de la reconstitution Fe/S des complexes NIU (**B**) et NIUF (**C**) **D.** Cinétiques de reconstitution Fe/S obtenues grâce au suivi de l'absorbance à 456 nm.

De même qu'en présence de DTT, une espèce absorbant vers 320 nm est présente dans les tous premiers temps de la réaction et pourrait correspondre soit à du Fe^{3+}, soit au persulfure sur NFS1 (**Figure VI. 3** (**A**)). Les spectres de différences montrent également la présence de centres [4Fe-4S] aussi bien en absence qu'en présence de FXN (**Figure VI. 3** (**B**)). Le suivi de l'absorbance à 456 nm montre que FXN stimule la biogenèse des centres Fe/S dans ces conditions.

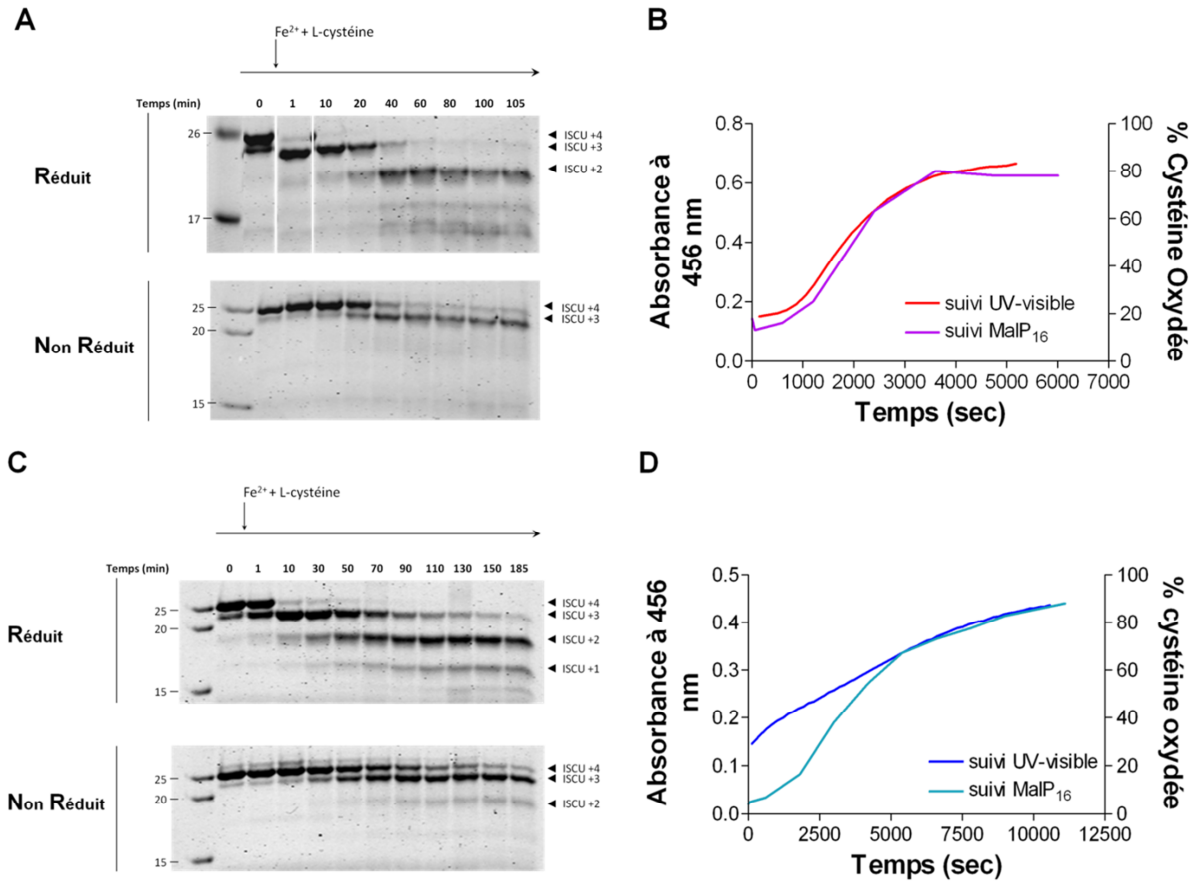


Figure VI. 4. Reconstitution des centres Fe/S sur les complexes NIU et NIUF, en absence de DTT, suivi par alkylation au $MalP_{16}$. A. Gels SDS-PAGE en conditions réductrices (haut) ou non (bas) du complexe NIUF (50 µM), incubé avec 4 équivalents de fer et 30 équivalents de L-cystéine. **B.** Cinétiques de reconstitution Fe/S obtenues par le suivi par spectroscopie UV-visible et par alkylation au $MalP_{16}$, sur le complexe NIUF. **C.** Gels SDS-PAGE en conditions réductrices (haut) ou non (bas) du complexe NIU (50 µM), incubé avec 4 équivalents de fer et 30 équivalents de L-cystéine. **B.** Cinétiques de reconstitution Fe/S obtenues par le suivi par spectroscopie UV-visible et par alkylation au $MalP_{16}$, sur le complexe NIU.

Le test d'alkylation au $MalP_{16}$ des complexes NIUF et NIU présenté **Figure VI. 4** (**A**) et (**C**), montre l'apparition de plusieurs formes partiellement alkylées d'ISCU. La forme « ISCU + 3 » est formée très rapidement, après quelques secondes de réaction. Puis une forme « ISCU + 2 » est observée en absence et également en présence de FXN (Courbes violette et bleu claire, **Figure VI. 4** (**B**) et (**D**)), avec une cinétique de formation accélérée en présence de FXN. Ces résultats suggèrent qu'en absence de DTT, plusieurs cystéines d'ISCU sont

persulfurées au cours de l'assemblage des centres Fe/S. Cependant, l'analyse des réactions en conditions non-réductrices, montre la formation d'une espèce d'ISCU contenant une cystéine non alkylable et dont la cinétique de formation suit celle de l'apparition de la forme « ISCU + 2 ». Cette analyse montre donc qu'une cystéine d'ISCU est rapidement persulfurée et qu'une autre cystéine d'ISCU est oxydée avec une cinétique potentiellement corrélée à l'assemblage des centres Fe/S. Plusieurs modifications pourraient conduire à une oxydation sur une seule cystéine : un acide sulfénique (R-SOH), sulfinique ($R-SO_2H$) ou sulfonique ($R-SO_3H$), un sulfénamide (R-SN-) ou une S-thiolation (R-SSR'), comme par exemple, une S-cystéinylation (R-SS-Cys) car les réactions ont été réalisées en présence de L-cystéine. La formation d'acides sulfénique, sulfinique ou sulfonique est peu probable, car les réactions de reconstitution se sont déroulées sous atmosphère contrôlée où la présence d'oxygène a été minimisée au maximum. La réaction de formation de sulfénamide nécessite que la cystéine soit préalablement oxydée sous forme d'un acide sulfénique ou d'un persulfure. La formation de sulfénamide impliquerait donc que deux cystéines d'ISCU soient persulfurées au cours de la reconstitution de centres Fe/S, ce qui semble exclu d'après les expériences que nous avons réalisé précédemment (Cf. Chapitre V). Enfin, la S-thiolation pourrait être le résultat d'une réaction entre de la L-cystéine persulfurée (L-Cys-SSH), générée par réduction du persulfure de NFS1, et une des cystéines non-persulfurée d'ISCU.

A . 3 . Etude du mutant M106I d'ISCU

Nous avons également étudié le comportement du mutant M106I d'ISCU pour lequel nous avons montré que le transfert de soufre de NFS1 à ISCU est stimulé dans les 5 premières minutes de la réaction tandis que la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 est identique au sauvage. La cinétique de reconstitution des centres Fe/S ne présente pas de différence avec ce mutant M106I en comparaison de la protéine sauvage. Ces résultats suggèrent que la cinétique d'assemblage est corrélée à la réduction du persulfure de NFS1 et pas à la formation du persulfure sur ISCU.

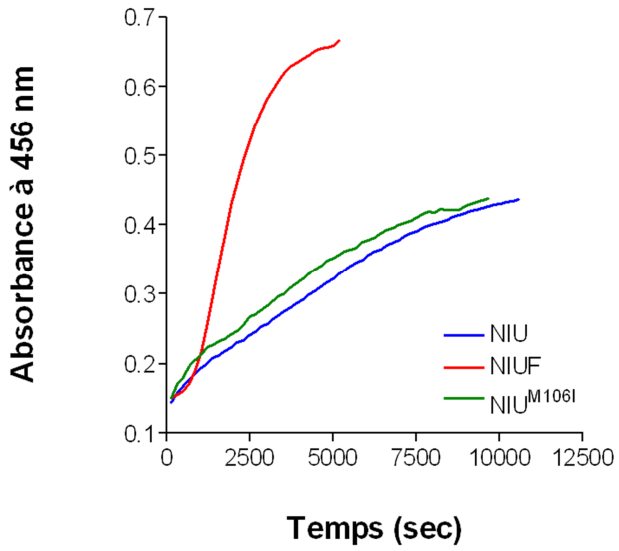


Figure VI. 5. Effet du mutant M106I d'ISCU au cours de la reconstitution des centres Fe/S. Cinétiques de reconstitution Fe/S obtenues lors du suivi par spectroscopie UV-visible du complexe NIU^{M106I} (50 µM), incubé avec 4 équivalents de fer et 30 équivalents de L-cystéine.

Ainsi, ces résultats préliminaires indiquent que le persulfure d'ISCU n'est pas réduit par la L-cystéine et donc qu'il n'est pas incorporé aux centres Fe/S. En absence de DTT, une seconde cystéine est oxydée probablement par S-cystéinylation et cette oxydation semble être corrélée à la formation de centres Fe/S sur ISCU.

B . Discussion - Conclusion

Ces résultats préliminaires de reconstitution d'un centre Fe/S sur la protéine ISCU avec le complexe NFS1-ISD11-ISCU en présence ou non de la protéine FXN, montrent que dans nos conditions expérimentales, l'atome de soufre du persulfure d'ISCU n'est pas incorporé au sein du centre Fe/S synthétisé. Ces résultats sont cohérents avec nos résultats sur la différence de vitesse de réduction des persulfures de NFS1 et d'ISCU (Cf. Chapitre IV et V). Cependant, d'après les vitesses de réduction du persulfure d'ISCU (plus de 60 min pour une réduction totale d'ISCU) et les cinétiques de formation du centre Fe/S (entre 80 et 250 minutes pour une réaction totale selon que FXN est présente ou non), ce persulfure aurait dû être réduit. Il est donc probable que le fer présent dans le milieu réactionnel empêche cette réduction. De plus, ces résultats suggèrent que le persulfure d'ISCU est capable de lier les centres Fe/S. La réduction de ce persulfure par une réductase encore inconnue pourrait faciliter le transfert du centre Fe/S vers les protéines cibles. Une autre hypothèse serait que ce

persulfure sert de relais pour le transfert de soufre vers le cytosol via le composé X exporté par la machinerie EXPORT (Cf. Chapitre d'introduction).

Ces résultats sont surprenants et les hypothèses que nous formulons à ce stade ne sont étayées par aucune donnée de la littérature. En ce sens, il faut noter que dans nos conditions, les vitesses de reconstitution des centres Fe/S sur ISCU (de l'ordre d'une heure avec ou sans DTT) sont très lentes par rapport à d'autres processus biologiques tels que la synthèse protéique. De plus, en calculant la quantité de soufre généré au cours de la réaction de reconstitution en présence de la frataxine, à l'aide de la constante de réduction du persulfure de NFS1 (7 $M^{-1}.s^{-1}$) et en prenant les concentration utilisées (50 µM de protéines et 1,5 mM de L-cystéine), nous obtenons des concentrations de l'ordre de 2 mM de soufre généré en 1 heure, ce qui représente environ 40 équivalents de soufre par ISCU et donc 10 fois plus de soufre que ce qui est nécessaire pour former un centre [4Fe-4S]. Ces calculs montrent que la réaction de reconstitution n'est pas efficace dans ces conditions et nécessite probablement l'intervention d'une autre protéine, potentiellement une réductase des persulfures plus efficace que la L-cystéine qui viendrait réduire le persulfure d'ISCU ce qui aurait l'avantage de générer du soufre à proximité du site d'assemblage du centre Fe/S.

Enfin, l'étude de reconstitution de centres Fe/S avec le mutant M106I d'ISCU ne montre aucune différence par rapport à la protéine sauvage. D'après Pandey *et al.* (Pandey *et al.* 2013), ce mutant d'ISCU est capable de contourner le rôle de la frataxine. Cependant, il ne semble pas y avoir d'effet sur la cinétique de reconstitution des centres Fe/S *in vitro*. Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet de cette mutation sur la vitesse de réduction du persulfure de NFS1 et indiquent à nouveau que le persulfure d'ISCU n'intervient pas dans la reconstitution de centre Fe/S dans ces conditions. Cependant, *in vivo*, la biogenèse des centres Fe/S est partiellement restaurée dans des souches de levure *Δyfh1* exprimant le mutant M107I d'Isu1 (homologue du mutant M106I d'ISCU) (Pandey *et al.* 2013; Yoon *et al.* 2014). Il est donc probable qu'en conditions physiologiques, l'activation de la transpersulfuration, que nous avons observé *in vitro*, joue un rôle essentiel pour l'assemblage des centres Fe/S. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle un autre réducteur (enzyme ou molécule) est nécessaire pour une synthèse efficace de centres Fe/S.

Chapitre VII

Conclusion générale

Chapitre VII. Conclusion Générale

Depuis sa découverte dans les années 90, la frataxine (FXN) est une protéine qui suscite un très grand intérêt. Chez l'homme, cette petite protéine mitochondriale est responsable de l'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative sévère. Malgré d'intenses recherches, la fonction cellulaire de la frataxine n'est pas encore clairement déterminée. Depuis quelques années, il est établit que la frataxine est impliquée dans les premières étapes de la biogenèse des centres Fe/S, notamment par l'interaction de la protéine avec le complexe NFS1-ISD11-ISCU (NIU) et par la stimulation de l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU (production d'ions sulfures).

Pour comprendre le mécanisme par lequel la frataxine stimule l'activité cystéine désulfurase du complexe NIU, nous avons étudié séparément les réactions de formation et de réduction du persulfure de NFS1, grâce à un test de détection des persulfures basé sur des différences de migration sur gel d'électrophorèse et utilisant des composés maléimides rattachés à une chaîne peptidique de 16 acides aminés, qui induisent des changements visibles sur gel. Ainsi, nous avons démontré qu'un persulfure se forme sur la cystéine catalytique de NFS1 et que ni ISCU, ni la frataxine ne sont requises pour cette réaction. Nous avons mis en évidence un transfert de soufre direct entre NFS1 et ISCU, qui conduit à l'accumulation d'un persulfure sur la cystéine C104 d'ISCU et à une plus petite quantité sur la cystéine C35. L'étude du mutant C35S montrant que le transfert de soufre sur la cystéine C104 est bloqué, nous a conduits à formuler l'hypothèse que la cystéine C35 d'ISCU pourrait être un relais pour la persulfuration de la cystéine C104. Cependant, nous n'avons pas pu valider ce modèle avec l'étude du mutant C104S, qui ne montre pas d'accumulation de persulfure sur la cystéine C35 ; potentiellement car cette mutation altère localement la structure d'ISCU et empêche le transfert sur la cystéine C35. Il serait intéressant par la suite de réaliser des études par cinétiques rapides afin de déterminer si la cystéine C35 d'ISCU est la cible primaire du transfert de soufre ou si les deux cystéines C104 et C35 sont capables de recevoir directement le soufre provenant du persulfure de NFS1.

Les deux découvertes importantes de ces travaux ont été de montrer que la frataxine accélère directement deux réactions : le transfert de soufre entre NFS1 et ISCU et la réduction du persulfure de NFS1 par des réducteurs externes à thiol. Nous avons également pu corréler

la stimulation de la réduction du persulfure de NFS1 avec une stimulation de l'assemblage des centres Fe/S.

Etonnamment, nous avons constaté que le persulfure d'ISCU ne contribue pas à l'activité cystéine désulfurase et qu'il n'est pas non plus incorporé au sein du centre Fe/S, que ce soit en présence ou en absence de FXN ; ce qui soulève la question du rôle du persulfure d'ISCU dans la biogenèse des centres Fe/S. L'étude du mutant M106I d'ISCU, qui est capable de restaurer partiellement la biogenèse des centres Fe/S *in vivo* et en absence de frataxine, montre une activation de la transpersulfuration dans les premières minutes de la réaction ; ce qui laisse penser que le persulfure d'ISCU est indispensable pour la synthèse d'un centre Fe/S. De plus, les expériences de reconstitution que nous avons menées montrent que l'assemblage des centres Fe/S *via* la réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine ou le DTT est très lent, ce qui suggère que ces réducteurs ne seraient pas suffisamment efficaces pour permettre l'assemblage des centres Fe/S dans un contexte physiologique. Ces observations amènent une nouvelle question, existe-il une réductase efficace du persulfure d'ISCU ou de NFS1 qui pourrait permettre l'assemblage des centres Fe/S ? Nous avons abordé cette question en étudiant les activités persulfure réductase de deux protéines candidats, GLRX5 et FDX2. Malheureusement, nous n'avons pas détecté d'activité avec ces enzymes. Cependant, il a été montré avec le système bactérien, que CyaY en se liant à IscS était capable de déplacer la ferrédoxine fixée à IscS (Kim *et al.* 2013), il est donc possible que la présence d'une quantité stœchiométrique de frataxine dans notre système soit de nature à bloquer l'accès de NFS1 à FDX2. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier des mélanges contenant NFS1-ISD11, ISCU, FXN et FDX2 dans différentes proportions.

En l'absence de données sur le rôle du persulfure d'ISCU, nos résultats ne permettent donc pas d'exclure un mécanisme de biosynthèse passant par la réduction du persulfure d'ISCU. Dans ce contexte, quel serait alors le rôle de l'activation de la réduction du persulfure de NFS1 par les thiols externes ? Une hypothèse qu'il serait intéressant d'évaluer est celle de la production de L-cystéine et de GSH (deux réducteurs physiologiques potentiels) persulfurés (L-CysSSH et GSSH) qui pourraient être des transporteurs de persulfure afin notamment d'alimenter la machinerie cytosolique CIA. En d'autres termes ces molécules pourraient correspondre au composé X exporté par le transporteur transmembranaire ABCB7 vers le cytosol (Schaedler *et al.* 2014). Enfin, il faut noter que le rôle de la frataxine dans l'activation du transfert de soufre entre NFS1 et ISCU pourrait s'apparenter à celui de SufE dans le système d'assemblage SUF, qui permet le transfert de soufre de SufS vers le complexe

d'assemblage SufBCD. Dans ce système, SufE stimule à la fois la formation du persulfure sur la cystéine désulfurase SufS (qui est l'étape limitante du cycle catalytique des cystéines désulfurases de type II à la différence de celles de types I telles que NFS1) et, *via* son unique résidu cystéine, le transfert de soufre vers le complexe d'échafaudage SufBCD (Loiseau *et al.* 2003; Goldsmith-Fischman *et al.* 2004; Layer *et al.* 2007). Malgré des fonctionnements très différents, l'un stimulant la formation du persulfure (SufE) et l'autre sa réduction (FXN), les rôles physiologiques de ces deux protéines semblent être assez proches en permettant un transfert de soufre vers le site d'assemblage des centres Fe/S.

D'un point de vue mécanistique, les réactions de transfert et de réduction stimulées par la frataxine sont très similaires, avec l'attaque nucléophile d'un thiol (cystéine d'ISCU ou réducteurs externes) sur un persulfure conduisant à la persulfuration du thiol nucléophile. L'ensemble des résultats indiquent donc que la frataxine agit comme un « stimulateur » des réactions de réduction de persulfure par un thiol. Ce type de réaction s'apparente aux réactions d'échange (ou réduction) de pont disulfures par les thiols qui sont catalysées par des oxydoréductases telles que les thiorédoxines (Trx) et les glutarédoxines (Grx). Mais à la différence des Trx et des Grx, la frataxine ne possède pas de cystéine catalytique pour catalyser cette réaction. En nous inspirant du mécanisme de ces enzymes et de celui des péroxydases, nous avons avancé un modèle dans lequel la frataxine augmente le caractère nucléophile du thiol du réducteur par déprotonation de ce thiol en thiolate. L'étude du mutant R162A de FXN, qui pointe vers l'extérieur de FXN et montre une diminution de l'activation du transfert de soufre d'un facteur 4, suggère que l'activation par déprotonation par l'intermédiaire de l'arginine R162 de FXN est un mécanisme à envisager pour de futures études. Mais une réponse définitive à cette question pourrait être apportée par la résolution d'une structure cristallographique par diffraction des rayons X ou par RMN.

Au final, même si nos résultats apportent un éclairage nouveau sur le rôle de la frataxine mammifère dans l'assemblage des centres Fe/S, ils ne permettent pas de résoudre le paradoxe entre CyaY qui semble inhiber cet assemblage et FXN qui le stimule. Les effets opposés de ces deux frataxines sont étonnant étant donné le niveau de conservation de leurs séquences et de leurs structures. Cependant, à la différence d'ISCU mammifère que nous trouvons mono-persulfurée, la protéine IscU procaryote a été trouvée poly-persulfurée en présence de la cystéine désulfurase IscS (Smith *et al.* 2001; Smith *et al.* 2005). De plus, l'activité cystéine désulfurase d'IscS est environ 5 fois supérieure à celle de NFS1. Le rôle de CyaY pourrait donc être d'atténuer l'activité cystéine désulfurase d'IscS pour éviter ces poly-

persulfurations. Cependant, ces deux fonctions, stimulateur et atténuateur de transfert et de réduction, sont difficilement compatibles avec le mécanisme que nous décrivons pour FXN mammifère. Il serait intéressant par la suite, d'évaluer l'effet de CyaY sur les réactions de transfert et de réduction de persulfure d'IscS ; car cela n'a jamais été clairement étudié.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Adam, A. C., C. Bornhovd, H. Prokisch, W. Neupert and K. Hell (2006). "The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria." EMBO J **25**(1): 174-83.

Adamec, J., F. Rusnak, W. G. Owen, S. Naylor, L. M. Benson, A. M. Gacy and G. Isaya (2000). "Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia." Am J Hum Genet **67**(3): 549-62.

Adinolfi, S., C. Iannuzzi, F. Prischi, C. Pastore, S. Iametti, S. R. Martin, F. Bonomi and A. Pastore (2009). "Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS." Nat Struct Mol Biol **16**(4): 390-6.

Adinolfi, S., F. Rizzo, L. Masino, M. Nair, S. R. Martin, A. Pastore and P. A. Temussi (2004). "Bacterial IscU is a well folded and functional single domain protein." Eur J Biochem **271**(11): 2093-100.

Adinolfi, S., M. Trifuoggi, A. S. Politou, S. Martin and A. Pastore (2002). "A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins." Hum Mol Genet **11**(16): 1865-77.

Agar, J. N., C. Krebs, J. Frazzon, B. H. Huynh, D. R. Dean and M. K. Johnson (2000). "IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU." Biochemistry **39**(27): 7856-62.

Aloria, K., B. Schilke, A. Andrew and E. A. Craig (2004). "Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo." EMBO Rep **5**(11): 1096-101.

Amela, I., P. Delicado, A. Gomez, E. Querol and J. Cedano (2013). "A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria." Protein J **32**(3): 183-96.

Andrew, A. J., R. Dutkiewicz, H. Knieszner, E. A. Craig and J. Marszalek (2006). "Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p." J Biol Chem **281**(21): 14580-7.

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

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

Balk, J., D. J. Aguilar Netz, K. Tepper, A. J. Pierik and R. Lill (2005). "The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly." Mol Cell Biol **25**(24): 10833-41.

Balk, J., A. J. Pierik, D. J. Netz, U. Muhlenhoff and R. Lill (2004). "The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins." EMBO J **23**(10): 2105-15.

Bedekovics, T., G. B. Gajdos, G. Kispal and G. Isaya (2007). "Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the Escherichia coli frataxin homolog CyaY." FEMS Yeast Res **7**(8): 1276-84.

Bednar, R. A. (1990). "Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to N-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase." Biochemistry **29**(15): 3684-90.

Behshad, E. and J. M. Bollinger, Jr. (2009). "Kinetic analysis of cysteine desulfurase CD0387 from Synechocystis sp. PCC 6803: formation of the persulfide intermediate." Biochemistry **48**(50): 12014-23.

Behshad, E., S. E. Parkin and J. M. Bollinger, Jr. (2004). "Mechanism of cysteine desulfurase Slr0387 from Synechocystis sp. PCC 6803: kinetic analysis of cleavage of the persulfide intermediate by chemical reductants." Biochemistry **43**(38): 12220-6.

Beilschmidt, L. K. and H. M. Puccio (2014). "Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease." Biochimie **100**: 48-60.

Beinert, H. and R. H. Sands (1960). "Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparation by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy." Biochem Biophys Res Commun.

Bencze, K. Z., K. C. Kondapalli, J. D. Cook, S. McMahon, C. Millan-Pacheco, N. Pastor and T. L. Stemmler (2006). "The structure and function of frataxin." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(5): 269-91.

Berkovitch, F., Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett and C. L. Drennan (2004). "Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme." Science **303**(5654): 76-9.

Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli." J Bacteriol **62**(3): 293-300.

Biederbick, A., O. Stehling, R. Rosser, B. Niggemeyer, Y. Nakai, H. P. Elsasser and R. Lill (2006). "Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation." Mol Cell Biol **26**(15): 5675-87.

Boal, A. K., E. Yavin, O. A. Lukianova, V. L. O'Shea, S. S. David and J. K. Barton (2005). "DNA-bound redox activity of DNA repair glycosylases containing [4Fe-4S] clusters." Biochemistry **44**(23): 8397-407.

Bonomi, F., S. Iametti, A. Morleo, D. Ta and L. E. Vickery (2008). "Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones." Biochemistry **47**(48): 12795-801.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

Branda, S. S., P. Cavadini, J. Adamec, F. Kalousek, F. Taroni and G. Isaya (1999). "Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase." J Biol Chem **274**(32): 22763-9.

Brereton, P. S., R. E. Duderstadt, C. R. Staples, M. K. Johnson and M. W. Adams (1999). "Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [Fe4S4] cluster of Pyrococcus furiosus ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties." Biochemistry **38**(32): 10594-605.

Bridwell-Rabb, J., N. G. Fox, C. L. Tsai, A. M. Winn and D. P. Barondeau (2014). "Human Frataxin Activates Fe-S Cluster Biosynthesis by Facilitating Sulfur Transfer Chemistry." Biochemistry.

Bridwell-Rabb, J., C. Iannuzzi, A. Pastore and D. P. Barondeau (2012). "Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis." Biochemistry **51**(12): 2506-14.

Bridwell-Rabb, J., A. M. Winn and D. P. Barondeau (2011). "Structure-function analysis of Friedreich's ataxia mutants reveals determinants of frataxin binding and activation of the Fe-S assembly complex." Biochemistry **50**(33): 7265-74.

Bulteau, A. L., H. A. O'Neill, M. C. Kennedy, M. Ikeda-Saito, G. Isaya and L. I. Szweda (2004). "Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity." Science **305**(5681): 242-5.

Bych, K., S. Kerscher, D. J. Netz, A. J. Pierik, K. Zwicker, M. A. Huynen, R. Lill, U. Brandt and J. Balk (2008). "The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly." EMBO J **27**(12): 1736-46.

Cai, K., R. O. Frederick, J. H. Kim, N. M. Reinen, M. Tonelli and J. L. Markley (2013). "Human mitochondrial chaperone (mtHSP70) and cysteine desulfurase (NFS1) bind preferentially to the disordered conformation, whereas co-chaperone (HSC20) binds to the structured conformation of the iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU)." J Biol Chem **288**(40): 28755-70.

Calzolai, L., C. M. Gorst, Z. H. Zhao, Q. Teng, M. W. Adams and G. N. La Mar (1995). "1H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile Pyrococcus furiosus. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states." Biochemistry **34**(36): 11373-84.

Cameron, J. M., A. Janer, V. Levandovskiy, N. Mackay, T. A. Rouault, W. H. Tong, I. Ogilvie, E. A. Shoubridge and B. H. Robinson (2011). "Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes." Am J Hum Genet **89**(4): 486-95.

Campanella, A., G. Isaya, H. A. O'Neill, P. Santambrogio, A. Cozzi, P. Arosio and S. Levi (2004). "The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast." Hum Mol Genet **13**(19): 2279-88.

Campuzano, V., L. Montermini, Y. Lutz, L. Cova, C. Hindelang, S. Jiralerspong, Y. Trottier, S. J. Kish, B. Faucheux, P. Trouillas, F. J. Authier, A. Durr, J. L. Mandel, A. Vescovi, M. Pandolfo and M. Koenig (1997). "Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes." Hum Mol Genet **6**(11): 1771-80.

Campuzano, V., L. Montermini, M. D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Canizares, H. Koutnikova, S. I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P. I. Patel, S. Di Donato, J. L. Mandel, S. Cocozza, M. Koenig and M. Pandolfo (1996). "Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion." Science **271**(5254): 1423-7.

Canal, F. (2007). "Rôle de la protéine Nfs1 dans la biosynthèse des centres fer-soufre dans les cellules de mammifères." Thèse de Doctorat.

Cavadini, P., G. Biasiotto, M. Poli, S. Levi, R. Verardi, I. Zanella, M. Derosas, R. Ingrassia, M. Corrado and P. Arosio (2007). "RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload." Blood **109**(8): 3552-9.

Chamberlain, S., J. Shaw, A. Rowland, J. Wallis, S. South, Y. Nakamura, A. von Gabain, M. Farrall and R. Williamson (1988). "Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9." Nature **334**(6179): 248-50.

Chandramouli, K., M. C. Unciuleac, S. Naik, D. R. Dean, B. H. Huynh and M. K. Johnson (2007). "Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein." Biochemistry **46**(23): 6804-11.

Chen, O. S., S. Hemenway and J. Kaplan (2002). "Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12321-6.

Cho, S. J., M. G. Lee, J. K. Yang, J. Y. Lee, H. K. Song and S. W. Suh (2000). "Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8932-7.

Ciesielski, S. J., B. A. Schilke, J. Osipiuk, L. Bigelow, R. Mulligan, J. Majewska, A. Joachimiak, J. Marszalek, E. A. Craig and R. Dutkiewicz (2012). "Interaction of J-protein co-chaperone Jac1 with Fe-S scaffold Isu is indispensable in vivo and conserved in evolution." J Mol Biol **417**(1-2): 1-12.

Colin, F., A. Martelli, M. Clemancey, J. M. Latour, S. Gambarelli, L. Zeppieri, C. Birck, A. Page, H. Puccio and S. Ollagnier de Choudens (2013). "Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly." J Am Chem Soc **135**(2): 733-40.

Condo, I., N. Ventura, F. Malisan, B. Tomassini and R. Testi (2006). "A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival." J Biol Chem **281**(24): 16750-6.

Cook, J. D., K. Z. Bencze, A. D. Jankovic, A. K. Crater, C. N. Busch, P. B. Bradley, A. J. Stemmler, M. R. Spaller and T. L. Stemmler (2006). "Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein." Biochemistry **45**(25): 7767-77.

Cunningham, R. P., H. Asahara, J. F. Bank, C. P. Scholes, J. C. Salerno, K. Surerus, E. Munck, J. McCracken, J. Peisach and M. H. Emptage (1989). "Endonuclease III is an iron-sulfur protein." Biochemistry **28**(10): 4450-5.

Cupp-Vickery, J. R., H. Urbina and L. E. Vickery (2003). "Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from Escherichia coli." J Mol Biol **330**(5): 1049-59.

Dai, Y. and F. W. Outten (2012). "The E. coli SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU." FEBS Lett **586**(22): 4016-22.

Dai, Z., M. Tonelli and J. L. Markley (2012). "Metamorphic protein IscU changes conformation by cis-trans isomerizations of two peptidyl-prolyl peptide bonds." Biochemistry **51**(48): 9595-602.

DerVartanian, D. V., W. H. Orme-Johnson, R. E. Hansen and H. Beinert (1967). "Identification of sulfur as component of the EPR signal at g equals 1.94 by isotopic substitution." Biochem Biophys Res Commun **26**(5): 569-76.

Dhe-Paganon, S., R. Shigeta, Y. I. Chi, M. Ristow and S. E. Shoelson (2000). "Crystal structure of human frataxin." J Biol Chem **275**(40): 30753-6.

Ding, H., J. Yang, L. C. Coleman and S. Yeung (2007). "Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions." J Biol Chem **282**(11): 7997-8004.

Dobritzsch, D., G. Schneider, K. D. Schnackerz and Y. Lindqvist (2001). "Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil." EMBO J **20**(4): 650-60.

Duby, G., F. Foury, A. Ramazzotti, J. Herrmann and T. Lutz (2002). "A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly." Hum Mol Genet **11**(21): 2635-43.

Dutkiewicz, R., B. Schilke, S. Cheng, H. Knieszner, E. A. Craig and J. Marszalek (2004). "Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function." J Biol Chem **279**(28): 29167-74.

Dutkiewicz, R., B. Schilke, H. Knieszner, W. Walter, E. A. Craig and J. Marszalek (2003). "Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart." J Biol Chem **278**(32): 29719-27.

Eliot, A. C. and J. F. Kirsch (2004). "Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations." Annu Rev Biochem **73**: 383-415.

Ferecatu, I., S. Goncalves, M. P. Golinelli-Cohen, M. Clemancey, A. Martelli, S. Riquier, E. Guittet, J. M. Latour, H. Puccio, J. C. Drapier, E. Lescop and C. Bouton (2014). "The Diabetes Drug Target MitoNEET Governs a Novel Trafficking Pathway to Rebuild an Fe-S Cluster into Cytosolic Aconitase/Iron Regulatory Protein 1." J Biol Chem.

Flint, D. H. (1996). "Escherichia coli contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of Azotobacter vinelandii and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase." J Biol Chem **271**(27): 16068-74.

Fontecave, M. and S. Ollagnier-de-Choudens (2008). "Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer." Arch Biochem Biophys **474**(2): 226-37.

Foury, F., A. Pastore and M. Trincal (2007). "Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly." EMBO Rep **8**(2): 194-9.

Fujii, T., M. Maeda, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki and Y. Hata (2000). "Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an Escherichia coli counterpart of mammalian selenocysteine lyase." Biochemistry **39**(6): 1263-73.

Fuzery, A. K., J. J. Oh, D. T. Ta, L. E. Vickery and J. L. Markley (2011). "Three hydrophobic amino acids in Escherichia coli HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex." BMC Biochem **12**: 3.

Fuzery, A. K., M. Tonelli, D. T. Ta, G. Cornilescu, L. E. Vickery and J. L. Markley (2008). "Solution structure of the iron-sulfur cluster cochaperone HscB and its binding surface for the iron-sulfur assembly scaffold protein IscU." Biochemistry **47**(36): 9394-404.

Gakh, O., S. Park, G. Liu, L. Macomber, J. A. Imlay, G. C. Ferreira and G. Isaya (2006). "Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity." Hum Mol Genet **15**(3): 467-79.

Genereux, J. C. and J. K. Barton (2010). "Mechanisms for DNA charge transport." Chem Rev **110**(3): 1642-62.

Geoghegan, K. F., H. B. Dixon, P. J. Rosner, L. R. Hoth, A. J. Lanzetti, K. A. Borzilleri, E. S. Marr, L. H. Pezzullo, L. B. Martin, P. K. LeMotte, A. S. McColl, A. V. Kamath and J. G. Stroh (1999). "Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in Escherichia coli: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins." Anal Biochem **267**(1): 169-84.

Georgiadis, M. M., H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J. J. Kornuc and D. C. Rees (1992). "Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from Azotobacter vinelandii." Science **257**(5077): 1653-9.

Gerber, J., U. Muhlenhoff and R. Lill (2003). "An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1." EMBO Rep **4**(9): 906-11.

Gibson, T. J., E. V. Koonin, G. Musco, A. Pastore and P. Bork (1996). "Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction." Trends Neurosci **19**(11): 465-8.

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin and S. G. Oliver (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-7.

Goldsmith-Fischman, S., A. Kuzin, W. C. Edstrom, J. Benach, R. Shastry, R. Xiao, T. B. Acton, B. Honig, G. T. Montelione and J. F. Hunt (2004). "The SufE sulfur-acceptor protein contains a conserved core structure that mediates interdomain interactions in a variety of redox protein complexes." J Mol Biol **344**(2): 549-65.

Grodick, M. A., H. M. Segal, T. J. Zwang and J. K. Barton (2014). "DNA-mediated signaling by proteins with 4Fe-4S clusters is necessary for genomic integrity." J Am Chem Soc **136**(17): 6470-8.

He, Y., S. L. Alam, S. V. Proteasa, Y. Zhang, E. Lesuisse, A. Dancis and T. L. Stemmler (2004). "Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrochelatase interaction." Biochemistry **43**(51): 16254-62.

Hoff, K. G., J. R. Cupp-Vickery and L. E. Vickery (2003). "Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system." J Biol Chem **278**(39): 37582-9.

Hoff, K. G., J. J. Silberg and L. E. Vickery (2000). "Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7790-5.

Hoff, K. G., D. T. Ta, T. L. Tapley, J. J. Silberg and L. E. Vickery (2002). "Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU." J Biol Chem **277**(30): 27353-9.

Huynen, M. A., B. Snel, P. Bork and T. J. Gibson (2001). "The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly." Hum Mol Genet **10**(21): 2463-8.

Iannuzzi, C., S. Adinolfi, B. D. Howes, R. Garcia-Serres, M. Clemancey, J. M. Latour, G. Smulevich and A. Pastore (2011). "The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the E. coli IscU scaffold protein." PLoS One **6**(7): e21992.

Iannuzzi, C., M. Adrover, R. Puglisi, R. Yan, P. A. Temussi and A. Pastore (2014). "The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein." Protein Sci **23**(9): 1208-19.

Iwata, S., M. Saynovits, T. A. Link and H. Michel (1996). "Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 A resolution." Structure **4**(5): 567-79.

Jacobson, M. R., K. E. Brigle, L. T. Bennett, R. A. Setterquist, M. S. Wilson, V. L. Cash, J. Beynon, W. E. Newton and D. R. Dean (1989). "Physical and genetic map of the major nif gene cluster from Azotobacter vinelandii." J Bacteriol **171**(2): 1017-27.

Jensen, L. T. and V. C. Culotta (2000). "Role of Saccharomyces cerevisiae ISA1 and ISA2 in iron homeostasis." Mol Cell Biol **20**(11): 3918-27.

Johansson, C., A. K. Roos, S. J. Montano, R. Sengupta, P. Filippakopoulos, K. Guo, F. von Delft, A. Holmgren, U. Oppermann and K. L. Kavanagh (2011). "The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity." Biochem J **433**(2): 303-11.

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

Johnson, M. A., A. Chatterjee, B. W. Neuman and K. Wuthrich (2010). "SARS coronavirus unique domain: three-domain molecular architecture in solution and RNA binding." J Mol Biol **400**(4): 724-42.

Kaiser, J. T., T. Clausen, G. P. Bourenkow, H. D. Bartunik, S. Steinbacher and R. Huber (2000). "Crystal structure of a NifS-like protein from Thermotoga maritima: implications for iron sulphur cluster assembly." J Mol Biol **297**(2): 451-64.

Karlberg, T., U. Schagerlof, O. Gakh, S. Park, U. Ryde, M. Lindahl, K. Leath, E. Garman, G. Isaya and S. Al-Karadaghi (2006). "The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron." Structure **14**(10): 1535-46.

Kato, S., H. Mihara, T. Kurihara, Y. Takahashi, U. Tokumoto, T. Yoshimura and N. Esaki (2002). "Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 5948-52.

Kaut, A., H. Lange, K. Diekert, G. Kispal and R. Lill (2000). "Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function." J Biol Chem **275**(21): 15955-61.

Khoroshilova, N., C. Popescu, E. Munck, H. Beinert and P. J. Kiley (1997). "Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of Escherichia coli by O2: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6087-92.

Kiley, P. J. and H. Beinert (2003). "The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(2): 181-5.

Kim, J. H., R. O. Frederick, N. M. Reinen, A. T. Troupis and J. L. Markley (2013). "[2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin." J Am Chem Soc **135**(22): 8117-20.

Kim, J. H., A. K. Fuzery, M. Tonelli, D. T. Ta, W. M. Westler, L. E. Vickery and J. L. Markley (2009). "Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB." Biochemistry **48**(26): 6062-71.

Kim, J. H., M. Tonelli, T. Kim and J. L. Markley (2012). "Three-dimensional structure and determinants of stability of the iron-sulfur cluster scaffold protein IscU from Escherichia coli." Biochemistry **51**(28): 5557-63.

Kim, J. H., M. Tonelli and J. L. Markley (2011). "Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): 454-9.

Kispal, G., P. Csere, C. Prohl and R. Lill (1999). "The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins." EMBO J **18**(14): 3981-9.

Koutnikova, H., V. Campuzano, F. Foury, P. Dolle, O. Cazzalini and M. Koenig (1997). "Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin." Nat Genet **16**(4): 345-51.

Koutnikova, H., V. Campuzano and M. Koenig (1998). "Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase." Hum Mol Genet **7**(9): 1485-9.

Krebs, C., J. N. Agar, A. D. Smith, J. Frazzon, D. R. Dean, B. H. Huynh and M. K. Johnson (2001). "IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis." Biochemistry **40**(46): 14069-80.

Kumar, C., A. Igbaria, B. D'Autreaux, A. G. Planson, C. Junot, E. Godat, A. K. Bachhawat, A. Delaunay-Moisan and M. B. Toledano (2011). "Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control." EMBO J **30**(10): 2044-56.

Land, T. and T. A. Rouault (1998). "Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization." Mol Cell **2**(6): 807-15.

Lange, H., T. Lisowsky, J. Gerber, U. Muhlenhoff, G. Kispal and R. Lill (2001). "An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins." EMBO Rep **2**(8): 715-20.

Lanzilotta, W. N., J. Christiansen, D. R. Dean and L. C. Seefeldt (1998). "Evidence for coupled electron and proton transfer in the [8Fe-7S] cluster of nitrogenase." Biochemistry **37**(32): 11376-84.

Lauble, H., M. C. Kennedy, H. Beinert and C. D. Stout (1992). "Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound." Biochemistry **31**(10): 2735-48.

Lauble, H., M. C. Kennedy, H. Beinert and C. D. Stout (1994). "Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound." J Mol Biol **237**(4): 437-51.

Lawson, D. M., A. Treffry, P. J. Artymiuk, P. M. Harrison, S. J. Yewdall, A. Luzzago, G. Cesareni, S. Levi and P. Arosio (1989). "Identification of the ferroxidase centre in ferritin." FEBS Lett **254**(1-2): 207-10.

Layer, G., S. A. Gaddam, C. N. Ayala-Castro, S. Ollagnier-de Choudens, D. Lascoux, M. Fontecave and F. W. Outten (2007). "SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly." J Biol Chem **282**(18): 13342-50.

Layer, G., S. Ollagnier-de Choudens, Y. Sanakis and M. Fontecave (2006). "Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU." J Biol Chem **281**(24): 16256-63.

Lee, M. G., S. J. Cho, J. K. Yang, H. K. Song and S. W. Suh (2000). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Escherichia coli CyaY, a structural homologue of human frataxin." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 7): 920-1.

Lesuisse, E., R. Santos, B. F. Matzanke, S. A. Knight, J. M. Camadro and A. Dancis (2003). "Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1)." Hum Mol Genet **12**(8): 879-89.

Li, D. S., K. Ohshima, S. Jiralerspong, M. W. Bojanowski and M. Pandolfo (1999). "Knock-out of the cyaY gene in Escherichia coli does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants." FEBS Lett **456**(1): 13-6.

Lill, R., B. Hoffmann, S. Molik, A. J. Pierik, N. Rietzschel, O. Stehling, M. A. Uzarska, H. Webert, C. Wilbrecht and U. Muhlenhoff (2012). "The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism." Biochim Biophys Acta **1823**(9): 1491-508.

Lin, J., L. Zhang, S. Lai and K. Ye (2011). "Structure and molecular evolution of CDGSH iron-sulfur domains." PLoS One **6**(9): e24790.

Lin, J., T. Zhou, K. Ye and J. Wang (2007). "Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14640-5.

Liu, J., N. Oganesyan, D. H. Shin, J. Jancarik, H. Yokota, R. Kim and S. H. Kim (2005). "Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form." Proteins **59**(4): 875-81.

Loiseau, L., S. Ollagnier-de-Choudens, L. Nachin, M. Fontecave and F. Barras (2003). "Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase." J Biol Chem **278**(40): 38352-9.

Lu, J., J. P. Bitoun, G. Tan, W. Wang, W. Min and H. Ding (2010). "Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIscA1." Biochem J **428**(1): 125-31.

Lukianova, O. A. and S. S. David (2005). "A role for iron-sulfur clusters in DNA repair." Curr Opin Chem Biol **9**(2): 145-51.

Lutz, T., B. Westermann, W. Neupert and J. M. Herrmann (2001). "The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria." J Mol Biol **307**(3): 815-25.

Majewska, J., S. J. Ciesielski, B. Schilke, J. Kominek, A. Blenska, W. Delewski, J. Y. Song, J. Marszalek, E. A. Craig and R. Dutkiewicz (2013). "Binding of the chaperone Jac1

protein and cysteine desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive." J Biol Chem **288**(40): 29134-42.

Mansy, S. S., G. Wu, K. K. Surerus and J. A. Cowan (2002). "Iron-sulfur cluster biosynthesis. Thermatoga maritima IscU is a structured iron-sulfur cluster assembly protein." J Biol Chem **277**(24): 21397-404.

Mansy, S. S., S. P. Wu and J. A. Cowan (2004). "Iron-sulfur cluster biosynthesis: biochemical characterization of the conformational dynamics of Thermotoga maritima IscU and the relevance for cellular cluster assembly." J Biol Chem **279**(11): 10469-75.

Marelja, Z., M. Mullick Chowdhury, C. Dosche, C. Hille, O. Baumann, H. G. Lohmannsroben and S. Leimkuhler (2013). "The L-cysteine desulfurase NFS1 is localized in the cytosol where it provides the sulfur for molybdenum cofactor biosynthesis in humans." PLoS One **8**(4): e60869.

Marinoni, E. N., J. S. de Oliveira, Y. Nicolet, E. C. Raulfs, P. Amara, D. R. Dean and J. C. Fontecilla-Camps (2012). "(IscS-IscU)2 complex structures provide insights into Fe2S2 biogenesis and transfer." Angew Chem Int Ed Engl **51**(22): 5439-42.

Markley, J. L., J. H. Kim, Z. Dai, J. R. Bothe, K. Cai, R. O. Frederick and M. Tonelli (2013). "Metamorphic protein IscU alternates conformations in the course of its role as the scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis and delivery." FEBS Lett **587**(8): 1172-9.

Martin, D., A. Charpilienne, A. Parent, A. Boussac, B. D'Autreaux, J. Poupon and D. Poncet (2013). "The rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA." FASEB J **27**(3): 1074-83.

Mather, B. D., K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long (2006). "Michael addition reactions in macromolecular design for emerging tehcnologies." Prog. Polym. Sci **31**(5): 487-531.

Mayer, S. M., D. M. Lawson, C. A. Gormal, S. M. Roe and B. E. Smith (1999). "New insights into structure-function relationships in nitrogenase: A 1.6 A resolution X-ray crystallographic study of Klebsiella pneumoniae MoFe-protein." J Mol Biol **292**(4): 871-91.

Michaelis, L. and M. L. Menten (1913). "Die kinetik der invertinwirkung." Biochem Z **49**: 333-369.

Mihara, H., T. Kurihara, T. Yoshimura and N. Esaki (2000). "Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from Escherichia coli: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions." J Biochem **127**(4): 559-67.

Muhlenhoff, U., J. Gerber, N. Richhardt and R. Lill (2003). "Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p." EMBO J **22**(18): 4815-25.

Muhlenhoff, U., N. Richhardt, M. Ristow, G. Kispal and R. Lill (2002). "The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins." Hum Mol Genet **11**(17): 2025-36.

Murphy, C. J., M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro and J. K. Barton (1993). "Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix." Science **262**(5136): 1025-9.

Musco, G., G. Stier, B. Kolmerer, S. Adinolfi, S. Martin, T. Frenkiel, T. Gibson and A. Pastore (2000). "Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin." Structure **8**(7): 695-707.

Naamati, A., N. Regev-Rudzki, S. Galperin, R. Lill and O. Pines (2009). "Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55." J Biol Chem **284**(44): 30200-8.

Nair, M., S. Adinolfi, C. Pastore, G. Kelly, P. Temussi and A. Pastore (2004). "Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites." Structure **12**(11): 2037-48.

Nakai, Y., Y. Yoshihara, H. Hayashi and H. Kagamiyama (1998). "cDNA cloning and characterization of mouse nifS-like protein, m-Nfs1: mitochondrial localization of eukaryotic NifS-like proteins." FEBS Lett **433**(1-2): 143-8.

Navarro-Sastre, A., F. Tort, O. Stehling, M. A. Uzarska, J. A. Arranz, M. Del Toro, M. T. Labayru, J. Landa, A. Font, J. Garcia-Villoria, B. Merinero, M. Ugarte, L. G. Gutierrez-Solana, J. Campistol, A. Garcia-Cazorla, J. Vaquerizo, E. Riudor, P. Briones, O. Elpeleg, A. Ribes and R. Lill (2011). "A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins." Am J Hum Genet **89**(5): 656-67.

Netz, D. J., A. J. Pierik, M. Stumpfig, U. Muhlenhoff and R. Lill (2007). "The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol." Nat Chem Biol **3**(5): 278-86.

Nichol, H., O. Gakh, H. A. O'Neill, I. J. Pickering, G. Isaya and G. N. George (2003). "Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study." Biochemistry **42**(20): 5971-6.

Nuth, M., T. Yoon and J. A. Cowan (2002). "Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]2+ cluster core in IscU proteins." J Am Chem Soc **124**(30): 8774-5.

Ollagnier-de-Choudens, S., T. Mattioli, Y. Takahashi and M. Fontecave (2001). "Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin." J Biol Chem **276**(25): 22604-7.

Pan, J. and K. S. Carroll (2013). "Persulfide reactivity in the detection of protein s-sulfhydration." ACS Chem Biol **8**(6): 1110-6.

Pandey, A., R. Golla, H. Yoon, A. Dancis and D. Pain (2012). "Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe-S cluster synthesis." Biochem J **448**(2): 171-87.

Pandey, A., D. M. Gordon, J. Pain, T. L. Stemmler, A. Dancis and D. Pain (2013). "Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly." J Biol Chem **288**(52): 36773-86.

Park, S., O. Gakh, H. A. O'Neill, A. Mangravita, H. Nichol, G. C. Ferreira and G. Isaya (2003). "Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation." J Biol Chem **278**(33): 31340-51.

Pastore, A. and H. Puccio (2013). "Frataxin: a protein in search for a function." J Neurochem **126 Suppl 1**: 43-52.

Peters, J. W., M. H. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson and D. C. Rees (1997). "Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster." Biochemistry **36**(6): 1181-7.

Picciocchi, A., C. Saguez, A. Boussac, C. Cassier-Chauvat and F. Chauvat (2007). "CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster." Biochemistry **46**(51): 15018-26.

Pohl, T., J. Walter, S. Stolpe, J. H. Soufo, P. L. Grauman and T. Friedrich (2007). "Effects of the deletion of the Escherichia coli frataxin homologue CyaY on the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase." BMC Biochem **8**: 13.

Prischi, F., P. V. Konarev, C. Iannuzzi, C. Pastore, S. Adinolfi, S. R. Martin, D. I. Svergun and A. Pastore (2010). "Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly." Nat Commun **1**: 95.

Puccio, H. and M. Koenig (2000). "Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia." Hum Mol Genet **9**(6): 887-92.

Puccio, H., D. Simon, M. Cossee, P. Criqui-Filipe, F. Tiziano, J. Melki, C. Hindelang, R. Matyas, P. Rustin and M. Koenig (2001). "Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits." Nat Genet **27**(2): 181-6.

Ramelot, T. A., J. R. Cort, S. Goldsmith-Fischman, G. J. Kornhaber, R. Xiao, R. Shastry, T. B. Acton, B. Honig, G. T. Montelione and M. A. Kennedy (2004). "Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site." J Mol Biol **344**(2): 567-83.

Raulfs, E. C., I. P. O'Carroll, P. C. Dos Santos, M. C. Unciuleac and D. R. Dean (2008). "In vivo iron-sulfur cluster formation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8591-6.

Rodriguez-Manzaneque, M. T., J. Tamarit, G. Belli, J. Ros and E. Herrero (2002). "Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes." Mol Biol Cell **13**(4): 1109-21.

Ross-Inta, C., C. Y. Tsai and C. Giulivi (2008). "The mitochondrial pool of free amino acids reflects the composition of mitochondrial DNA-encoded proteins: indication of a post-translational quality control for protein synthesis." Biosci Rep **28**(5): 239-49.

Rouault, T. A. (2006). "The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease." Nat Chem Biol **2**(8): 406-14.

Roy, A., N. Solodovnikova, T. Nicholson, W. Antholine and W. E. Walden (2003). "A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly." EMBO J **22**(18): 4826-35.

Rybniker, J., F. Pojer, J. Marienhagen, G. S. Kolly, J. M. Chen, E. van Gumpel, P. Hartmann and S. T. Cole (2014). "The cysteine desulfurase IscS of Mycobacterium tuberculosis is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and oxidative stress defence." Biochem J **459**(3): 467-78.

Sands, R. H. and H. Beinert (1960). "Studies on mitochondria and submitochondrial particles by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy." Biochem Biophys Res Commun.

Schaedler, T. A., J. D. Thornton, I. Kruse, M. Schwarzlander, A. J. Meyer, H. W. van Veen and J. Balk (2014). "A Conserved Mitochondrial ATP-binding Cassette Transporter Exports Glutathione Polysulfide for Cytosolic Metal Cofactor Assembly." J Biol Chem **289**(34): 23264-74.

Schilke, B., C. Voisine, H. Beinert and E. Craig (1999). "Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10206-11.

Schmucker, S., M. Argentini, N. Carelle-Calmels, A. Martelli and H. Puccio (2008). "The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin." Hum Mol Genet **17**(22): 3521-31.

Schmucker, S., A. Martelli, F. Colin, A. Page, M. Wattenhofer-Donze, L. Reutenauer and H. Puccio (2011). "Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex." PLoS One **6**(1): e16199.

Schoenfeld, R. A., E. Napoli, A. Wong, S. Zhan, L. Reutenauer, D. Morin, A. R. Buckpitt, F. Taroni, B. Lonnerdal, M. Ristow, H. Puccio and G. A. Cortopassi (2005). "Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells." Hum Mol Genet **14**(24): 3787-99.

Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert and P. J. Kiley (2001). "IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14895-900.

Seguin, A., R. Sutak, A. L. Bulteau, R. Garcia-Serres, J. L. Oddou, S. Lefevre, R. Santos, A. Dancis, J. M. Camadro, J. M. Latour and E. Lesuisse (2010). "Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo." Biochim Biophys Acta **1802**(6): 531-8.

Sen, N., B. D. Paul, M. M. Gadalla, A. K. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim and S. H. Snyder (2012). "Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-kappaB mediates its antiapoptotic actions." Mol Cell **45**(1): 13-24.

Shakamuri, P., B. Zhang and M. K. Johnson (2012). "Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins." J Am Chem Soc **134**(37): 15213-6.

Sheftel, A. D., O. Stehling, A. J. Pierik, H. P. Elsasser, U. Muhlenhoff, H. Webert, A. Hobler, F. Hannemann, R. Bernhardt and R. Lill (2010). "Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11775-80.

Sheftel, A. D., O. Stehling, A. J. Pierik, D. J. Netz, S. Kerscher, H. P. Elsasser, I. Wittig, J. Balk, U. Brandt and R. Lill (2009). "Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I." Mol Cell Biol **29**(22): 6059-73.

Sheftel, A. D., C. Wilbrecht, O. Stehling, B. Niggemeyer, H. P. Elsasser, U. Muhlenhoff and R. Lill (2012). "The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation." Mol Biol Cell **23**(7): 1157-66.

Shethna, Y. I., D. V. DerVartanian and H. Beinert (1968). "Non heme (iron-sulfur) proteins of Azotobacter vinelandii." Biochem Biophys Res Commun **31**(6): 862-8.

Shethna, Y. I., P. W. Wilson, R. E. Hansen and H. Beinert (1964). "Identification by Isotopic Substitution of the Epr Signal at G = 1.94 in a Non-Heme Iron Protein from Azotobacter." Proc Natl Acad Sci U S A **52**: 1263-71.

Shi, R., A. Proteau, M. Villarroya, I. Moukadiri, L. Zhang, J. F. Trempe, A. Matte, M. E. Armengod and M. Cygler (2010). "Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions." PLoS Biol **8**(4): e1000354.

Shi, Y., M. Ghosh, G. Kovtunovych, D. R. Crooks and T. A. Rouault (2012). "Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis." Biochim Biophys Acta **1823**(2): 484-92.

Shi, Y., M. C. Ghosh, W. H. Tong and T. A. Rouault (2009). "Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis." Hum Mol Genet **18**(16): 3014-25.

Shigi, N. (2014). "Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA." Front Genet **5**: 67.

Shisler, K. A. and J. B. Broderick (2012). "Emerging themes in radical SAM chemistry." Curr Opin Struct Biol **22**(6): 701-10.

Siegel, L. M. (1965). "A Direct Microdetermination for Sulfide." Anal Biochem **11**: 126-32.

Silberg, J. J., K. G. Hoff, T. L. Tapley and L. E. Vickery (2001). "The Fe/S assembly protein IscU behaves as a substrate for the molecular chaperone Hsc66 from Escherichia coli." J Biol Chem **276**(3): 1696-700.

Silberg, J. J., T. L. Tapley, K. G. Hoff and L. E. Vickery (2004). "Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU." J Biol Chem **279**(52): 53924-31.

Sipos, K., H. Lange, Z. Fekete, P. Ullmann, R. Lill and G. Kispal (2002). "Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione." J Biol Chem **277**(30): 26944-9.

Smith, A. D., J. N. Agar, K. A. Johnson, J. Frazzon, I. J. Amster, D. R. Dean and M. K. Johnson (2001). "Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis." J Am Chem Soc **123**(44): 11103-4.

Smith, A. D., J. Frazzon, D. R. Dean and M. K. Johnson (2005). "Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU." FEBS Lett **579**(23): 5236-40.

Song, D. and F. S. Lee (2008). "A role for IOP1 in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis." J Biol Chem **283**(14): 9231-8.

Sontz, P. A., N. B. Muren and J. K. Barton (2012). "DNA charge transport for sensing and signaling." Acc Chem Res **45**(10): 1792-800.

Srinivasan, V., D. J. Netz, H. Webert, J. Mascarenhas, A. J. Pierik, H. Michel and R. Lill (2007). "Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis." Structure **15**(10): 1246-57.

Srinivasan, V., A. J. Pierik and R. Lill (2014). "Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1." Science **343**(6175): 1137-40.

Stehling, O., D. J. Netz, B. Niggemeyer, R. Rosser, R. S. Eisenstein, H. Puccio, A. J. Pierik and R. Lill (2008). "Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis." Mol Cell Biol **28**(17): 5517-28.

Tamarit, J., G. Belli, E. Cabiscol, E. Herrero and J. Ros (2003). "Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin." J Biol Chem **278**(28): 25745-51.

Tong, W. H., G. N. Jameson, B. H. Huynh and T. A. Rouault (2003). "Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9762-7.

Tong, W. H. and T. A. Rouault (2006). "Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis." Cell Metab **3**(3): 199-210.

Tsai, C. L. and D. P. Barondeau (2010). "Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex." Biochemistry **49**(43): 9132-9.

Tsai, C. L., J. Bridwell-Rabb and D. P. Barondeau (2011). "Friedreich's ataxia variants I154F and W155R diminish frataxin-based activation of the iron-sulfur cluster assembly complex." Biochemistry **50**(29): 6478-87.

Tucker, N. P., B. D'Autreaux, F. K. Yousafzai, S. A. Fairhurst, S. Spiro and R. Dixon (2008). "Analysis of the nitric oxide-sensing non-heme iron center in the NorR regulatory protein." J Biol Chem **283**(2): 908-18.

Uhrigshardt, H., T. A. Rouault and F. Missirlis (2013). "Insertion mutants in Drosophila melanogaster Hsc20 halt larval growth and lead to reduced iron-sulfur cluster enzyme activities and impaired iron homeostasis." J Biol Inorg Chem **18**(4): 441-9.

Uhrigshardt, H., A. Singh, G. Kovtunovych, M. Ghosh and T. A. Rouault (2010). "Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis." Hum Mol Genet **19**(19): 3816-34.

Urbina, H. D., J. J. Silberg, K. G. Hoff and L. E. Vickery (2001). "Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly." J Biol Chem **276**(48): 44521-6.

Uzarska, M. A., R. Dutkiewicz, S. A. Freibert, R. Lill and U. Muhlenhoff (2013). "The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation." Mol Biol Cell **24**(12): 1830-41.

Vinella, D., C. Brochier-Armanet, L. Loiseau, E. Talla and F. Barras (2009). "Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers." PLoS Genet **5**(5): e1000497.

Wachtershauser, G. (1988). "Before enzymes and templates: theory of surface metabolism." Microbiol Rev **52**(4): 452-84.

Wiedemann, N., E. Urzica, B. Guiard, H. Muller, C. Lohaus, H. E. Meyer, M. T. Ryan, C. Meisinger, U. Muhlenhoff, R. Lill and N. Pfanner (2006). "Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins." EMBO J **25**(1): 184-95.

Wingert, R. A., J. L. Galloway, B. Barut, H. Foott, P. Fraenkel, J. L. Axe, G. J. Weber, K. Dooley, A. J. Davidson, B. Schmid, B. H. Paw, G. C. Shaw, P. Kingsley, J. Palis, H. Schubert, O. Chen, J. Kaplan and L. I. Zon (2005). "Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis." Nature **436**(7053): 1035-39.

Wu, S. P., S. S. Mansy and J. A. Cowan (2005). "Iron-sulfur cluster biosynthesis. Molecular chaperone DnaK promotes IscU-bound [2Fe-2S] cluster stability and inhibits cluster transfer activity." Biochemistry **44**(11): 4284-93.

Wu, Y. and R. M. Brosh, Jr. (2012). "DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster." Nucleic Acids Res **40**(10): 4247-60.

Xu, X. M. and S. G. Moller (2011). "Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance." Antioxid Redox Signal **15**(1): 271-307.

Yan, R., G. Kelly and A. Pastore (2014). "The Scaffold protein IscU Retains a structured conformation in the Fe-S cluster assembly complex." Chembiochem **15**(11): 1682-6.

Yan, R., P. V. Konarev, C. Iannuzzi, S. Adinolfi, B. Roche, G. Kelly, L. Simon, S. R. Martin, B. Py, F. Barras, D. I. Svergun and A. Pastore (2013). "Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS." J Biol Chem **288**(34): 24777-87.

Ye, H., S. Y. Jeong, M. C. Ghosh, G. Kovtunovych, L. Silvestri, D. Ortillo, N. Uchida, J. Tisdale, C. Camaschella and T. A. Rouault (2010). "Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts." J Clin Invest **120**(5): 1749-61.

Ye, H. and T. A. Rouault (2010). "Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease." Biochemistry **49**(24): 4945-56.

Yoon, H., R. Golla, E. Lesuisse, J. Pain, J. E. Donald, E. R. Lyver, D. Pain and A. Dancis (2012). "Mutation in the Fe-S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion." Biochem J **441**(1): 473-80.

Yoon, H., S. A. Knight, A. Pandey, J. Pain, Y. Zhang, D. Pain and A. Dancis (2014). "Frataxin-bypassing Isu1: characterization of the bypass activity in cells and mitochondria." Biochem J **459**(1): 71-81.

Zanella, I., M. Derosas, M. Corrado, E. Cocco, P. Cavadini, G. Biasiotto, M. Poli, R. Verardi and P. Arosio (2008). "The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin." Biochim Biophys Acta **1782**(2): 90-8.

Zeylemaker, W. P., D. V. Dervartanian and C. Veeger (1965). "The Amount of Non-Haem Iron and Acid-Labile Sulphur in Purified Pig-Heart Succinate Dehydrogenase." Biochim Biophys Acta **99**: 183-4.

Zhang, D., I. Macinkovic, N. O. Devarie-Baez, J. Pan, C. M. Park, K. S. Carroll, M. R. Filipovic and M. Xian (2014). "Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique." Angew Chem Int Ed Engl **53**(2): 575-81.

Zhang, Y., E. R. Lyver, E. Nakamaru-Ogiso, H. Yoon, B. Amutha, D. W. Lee, E. Bi, T. Ohnishi, F. Daldal, D. Pain and A. Dancis (2008). "Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis." Mol Cell Biol **28**(18): 5569-82.

Zheng, L., V. L. Cash, D. H. Flint and D. R. Dean (1998). "Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from Azotobacter vinelandii." J Biol Chem **273**(21): 13264-72.

Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash and D. R. Dean (1994). "Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product." Biochemistry **33**(15): 4714-20.

Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack and D. R. Dean (1993). "Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2754-8.

Annexes

Annexe 1. Comparaison des alignements des séquences codantes de NFS1 de souris (séquence 1) et du plasmide pCDFDuet NFS1-ISD11 (séquence 2)

Ces alignements de séquences nous permettent de mettre en évidence l'étiquette polyhistidine (bleu), le site de clivage de la thrombine (violet) ainsi que la mutation silencieuse (rouge), introduite pour enlever un site de clivage d'une enzyme de restriction.

```
Seq_1  ------------------------------------------------------------      0

Seq_2  ------------CCATGGGACACCACCACCACCACCATAGCCAGGATCTGGTGCCGCGC      47
       X  X  X  X  X  M  G  H  H  H  H  H  H  S  Q  D  L  V  P  R

       X  X  R  P  L  Y  M  D  V  Q  A  T  T  P  L  D  P  R  V  L
Seq_1  ------AGACCTCTCTACATGGACGTACAGGCCACCACTCCTCTGGATCCCAGAGTGCTT      54
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  GGCTCTAGACCTCTCTACATGGACGTACAGGCCACCACTCCTCTGGATCCCAGAGTGCTT      107
       G  S  R  P  L  Y  M  D  V  Q  A  T  T  P  L  D  P  R  V  L

       D  A  M  L  P  Y  L  V  N  Y  Y  G  N  P  H  S  R  T  H  A
Seq_1  GATGCCATGCTCCCATACCTTGTCAACTACTATGGGAACCCTCATTCTCGGACTCATGCA      114
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  GATGCCATGCTCCCATACCTTGTCAACTACTATGGGAACCCTCATTCTCGGACTCATGCA      167
       D  A  M  L  P  Y  L  V  N  Y  Y  G  N  P  H  S  R  T  H  A

       Y  G  W  E  S  E  A  A  M  E  R  A  R  Q  Q  V  A  S  L  I
Seq_1  TATGGCTGGGAGAGCGAGGCAGCAATGGAACGTGCTCGCCAGCAAGTAGCATCTCTGATT      174
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  TATGGCTGGGAGAGCGAGGCAGCAATGGAACGTGCTCGCCAGCAAGTAGCATCTCTGATT      227
       Y  G  W  E  S  E  A  A  M  E  R  A  R  Q  Q  V  A  S  L  I
```

```
      G  A  D  P  R  E  I  I  F  T  S  G  A  T  E  S  N  N  I  A

Seq_1 GGAGCTGATCCTCGGGAGATCATTTTCACTAGTGGAGCTACTGAGTCCAACAACATAGCA     234
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 GGAGCTGATCCTCGGGAGATCATTTTCACTAGTGGAGCTACTGAGTCCAACAACATAGCA     287
      G  A  D  P  R  E  I  I  F  T  S  G  A  T  E  S  N  N  I  A

      I  K  G  V  A  R  F  Y  R  S  R  K  K  H  L  V  T  T  Q  T

Seq_1 ATTAAGGGAGTGGCCAGGTTCTACAGGTCAAGGAAAAAACACTTGGTCACAACCCAGACA     294
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 ATTAAGGGAGTGGCCAGGTTCTACAGGTCAAGGAAAAAACACTTGGTCACAACCCAGACA     347
      I  K  G  V  A  R  F  Y  R  S  R  K  K  H  L  V  T  T  Q  T

      E  H  K  C  V  L  D  S  C  R  S  L  E  A  E  G  F  R  V  T

Seq_1 GAACACAAATGTGTGCTGGATTCCTGCCGCTCCCTGGAAGCTGAGGGCTTTCGGGTCACT     354
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 GAACACAAATGTGTGCTGGATTCCTGCCGCTCCCTGGAAGCTGAGGGCTTTCGGGTCACT     407
      E  H  K  C  V  L  D  S  C  R  S  L  E  A  E  G  F  R  V  T

      Y  L  P  V  Q  K  S  G  I  I  D  L  K  E  L  E  A  A  I  Q

Seq_1 TACCTCCCTGTGCAGAAGAGCGGGATCATTGACTTAAAGGAACTAGAGGCTGCCATCCAG     414
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 TACCTCCCTGTGCAGAAGAGCGGGATCATTGACTTAAAGGAACTAGAGGCTGCCATCCAG     467
      Y  L  P  V  Q  K  S  G  I  I  D  L  K  E  L  E  A  A  I  Q

      P  D  T  S  L  V  S  V  M  T  V  N  N  E  I  G  V  K  Q  P

Seq_1 CCAGACACCAGCCTGGTCTCCGTTATGACTGTGAACAATGAAATTGGAGTAAAGCAACCG     474
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 CCAGACACCAGCCTGGTCTCCGTTATGACTGTGAACAATGAAATTGGAGTAAAGCAACCA     527
      P  D  T  S  L  V  S  V  M  T  V  N  N  E  I  G  V  K  Q  P
```

```
      I  A  E  I  G  Q  I  C  S  S  R  K  V  Y  F  H  T  D  A  A

Seq_1 ATTGCAGAAATAGGGCAGATTTGTAGTTCCAGAAAGGTGTACTTCCACACTGATGCCGCC     534
      |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 ATTGCAGAAATAGGGCAGATTTGTAGTTCCAGAAAGGTGTACTTCCACACTGATGCCGCC     587
      I  A  E  I  G  Q  I  C  S  S  R  K  V  Y  F  H  T  D  A  A

      Q  A  V  G  K  I  P  L  D  V  N  D  M  K  I  D  L  M  S  I

Seq_1 CAAGCGGTTGGGAAAATCCCACTTGACGTCAATGACATGAAGATTGATCTCATGAGCATC     594
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 CAAGCGGTTGGGAAAATCCCACTTGACGTCAATGACATGAAGATTGATCTCATGAGCATC     647
      Q  A  V  G  K  I  P  L  D  V  N  D  M  K  I  D  L  M  S  I

      S  G  H  K  L  Y  G  P  K  G  V  G  A  I  Y  I  R  R  R  P

Seq_1 AGCGGTCACAAACTCTATGGCCCTAAAGGGGTTGGTGCTATCTATATCCGCCGTAGGCCC     654
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 AGCGGTCACAAACTCTATGGCCCTAAAGGGGTTGGTGCTATCTATATCCGCCGTAGGCCC     707
      S  G  H  K  L  Y  G  P  K  G  V  G  A  I  Y  I  R  R  R  P

      R  V  R  V  E  A  L  Q  S  G  G  G  Q  E  R  G  M  R  S  G

Seq_1 CGGGTACGTGTGGAGGCCCTACAGAGTGGAGGCGGGCAGGAGCGGGGTATGCGGTCTGGG     714
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 CGGGTACGTGTGGAGGCCCTACAGAGTGGAGGCGGGCAGGAGCGGGGTATGCGGTCTGGG     767
      R  V  R  V  E  A  L  Q  S  G  G  G  Q  E  R  G  M  R  S  G

      T  V  P  T  P  L  V  V  G  L  G  A  A  C  E  L  A  Q  Q  E

Seq_1 ACAGTGCCCACACCCTTGGTGGTGGGCCTGGGAGCTGCATGTGAGTTGGCACAACAAGAG     774
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 ACAGTGCCCACACCCTTGGTGGTGGGCCTGGGAGCTGCATGTGAGTTGGCACAACAAGAG     827
      T  V  P  T  P  L  V  V  G  L  G  A  A  C  E  L  A  Q  Q  E
```

```
      M  E  Y  D  H  K  R  I  S  K  L  A  E  R  L  V  Q  N  I  M

Seq_1 ATGGAATACGACCATAAGCGGATCTCAAAGTTAGCAGAGCGACTGGTACAGAACATAATG     834
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 ATGGAATACGACCATAAGCGGATCTCAAAGTTAGCAGAGCGACTGGTACAGAACATAATG     887
      M  E  Y  D  H  K  R  I  S  K  L  A  E  R  L  V  Q  N  I  M

      K  N  L  P  D  V  V  M  N  G  D  P  K  Q  H  Y  P  G  C  I

Seq_1 AAGAATCTTCCAGATGTGGTAATGAACGGGGACCCGAAGCAGCACTACCCTGGCTGTATC     894
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 AAGAATCTTCCAGATGTGGTAATGAACGGGGACCCGAAGCAGCACTACCCTGGCTGTATC     947
      K  N  L  P  D  V  V  M  N  G  D  P  K  Q  H  Y  P  G  C  I

      N  L  S  F  A  Y  V  E  G  E  S  L  L  M  A  L  K  D  V  A

Seq_1 AACCTCTCCTTCGCGTATGTGGAAGGAGAGAGCCTGCTGATGGCCCTCAAGGATGTGGCC     954
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 AACCTCTCCTTCGCGTATGTGGAAGGAGAGAGCCTGCTGATGGCCCTCAAGGATGTGGCC     1007
      N  L  S  F  A  Y  V  E  G  E  S  L  L  M  A  L  K  D  V  A

      L  S  S  G  S  A  C  T  S  A  S  L  E  P  S  Y  V  L  R  A

Seq_1 TTGTCCTCAGGGAGTGCCTGCACTTCTGCATCATTGGAGCCCTCTTATGTCCTCAGAGCA     1014
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 TTGTCCTCAGGGAGTGCCTGCACTTCTGCATCATTGGAGCCCTCTTATGTCCTCAGAGCA     1067
      L  S  S  G  S  A  C  T  S  A  S  L  E  P  S  Y  V  L  R  A

      I  G  T  D  E  D  L  A  H  S  S  I  R  F  G  I  G  R  F  T

Seq_1 ATTGGTACCGATGAGGATTTAGCACACTCCTCTATCAGGTTTGGCATCGGCCGCTTCACT     1074
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2 ATTGGTACCGATGAGGATTTAGCACACTCCTCTATCAGGTTTGGCATCGGCCGCTTCACT     1127
      I  G  T  D  E  D  L  A  H  S  S  I  R  F  G  I  G  R  F  T
```

```
      T  E  E  E  V  D  Y  T  A  E  K  C  I  H  H  V  K  R  L  R

Seq_1 ACAGAAGAGGAGGTGGACTACACGGCGGAGAAGTGCATCCACCACGTGAAGCGCCTTCGA     1134

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Seq_2 ACAGAAGAGGAGGTGGACTACACGGCGGAGAAGTGCATCCACCACGTGAAGCGCCTTCGA     1187

      T  E  E  E  V  D  Y  T  A  E  K  C  I  H  H  V  K  R  L  R


      E  M  S  P  L  W  E  M  V  Q  D  G  I  D  L  K  S  I  K  W

Seq_1 GAAATGAGTCCTCTCTGGGAGATGGTCCAGGATGGCATTGACCTCAAGAGCATCAAGTGG     1194

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Seq_2 GAAATGAGTCCTCTCTGGGAGATGGTCCAGGATGGCATTGACCTCAAGAGCATCAAGTGG     1247

      E  M  S  P  L  W  E  M  V  Q  D  G  I  D  L  K  S  I  K  W


      T  Q  H  *

Seq_1 ACCCAGCATTAG-----------------------------------------------     1206

      ||||||||||||

Seq_2 ACCCAGCATTAGCTCGAG-----------------------------------------     1265

      T  Q  H  *  L  E
```

Annexe 2. Séquence protéique de NFS1

A. Séquence de la protéine NFS1 de souris *in vivo* avec sa séquence d'adressage à la mitochondrie (vert). **B**. Séquence de la protéine recombinante NFS1 de souris avec l'étiquette polyhistidine (bleu) et le site de clivage de la thrombine (violet), MM = 46 328,1 Da. La cystéine catalytique de NFS1 est en rouge.

A

```
        10         20         30         40         50         60
MVGSVAGNML LRAAWRRASL AATSLALGRS SVPTRGLRLR VVDHGPHSPV HSEAEAVLRP

        70         80         90        100        110        120
LYMDVQATTP LDPRVLDAML PYLVNYYGNP HSRTHAYGWE SEAAMERARQ QVASLIGADP

       130        140        150        160        170        180
REIIFTSGAT ESNNIAIKGV ARFYRSRKKH LVTTQTEHKC VLDSCRSLEA EGFRVTYLPV

       190        200        210        220        230        240
QKSGIIDLKE LEAAIQPDTS LVSVMTVNNE IGVKQPIAEI GQICSSRKVY FHTDAAQAVG

       250        260        270        280        290        300
KIPLDVNDMK IDLMSISGHK LYGPKGVGAI YIRRRPRVRV EALQSGGGQE RGMRSGTVPT

       310        320        330        340        350        360
PLVVGLGAAC ELAQQEMEYD HKRISKLAER LVQNIMKNLP DVVMNGDPKQ HYPGCINLSF

       370        380        390        400        410        420
AYVEGESLLM ALKDVALSSG SACTSASLEP SYVLRAIGTD EDLAHSSIRF GIGRFTTEEE

       430        440        450
VDYTAEKCIH HVKRLREMSP LWEMVQDGID LKSIKWTQH
```

B

```
        10         20         30         40         50         60
GHHHHHHSQD   LVPRGSRPLY   MDVQATTPLD   PRVLDAMLPY   LVNYYGNPHS   RTHAYGWESE

        70         80         90        100        110        120
AAMERARQQV   ASLIGADPRE   IIFTSGATES   NNIAIKGVAR   FYRSRKKHLV   TTQTEHKCVL

       130        140        150        160        170        180
DSCRSLEAEG   FRVTYLPVQK   SGIIDLKELE   AAIQPDTSLV   SVMTVNNEIG   VKQPIAEIGQ

       190        200        210        220        230        240
ICSSRKVYFH   TDAAQAVGKI   PLDVNDMKID   LMSISGHKLY   GPKGVGAIYI   RRRPRVRVEA

       250        260        270        280        290        300
LQSGGGQERG   MRSGTVPTPL   VVGLGAACEL   AQQEMEYDHK   RISKLAERLV   QNIMKNLPDV

       310        320        330        340        350        360
VMNGDPKQHY   PGCINLSFAY   VEGESLLMAL   KDVALSSGSA   CTSASLEPSY   VLRAIGTDED

       370        380        390        400        410
LAHSSIRFGI GRFTTEEEVD YTAEKCIHHV KRLREMSPLW EMVQDGIDLK SIKWTQH
```

Annexe 3. Séquence protéique d'ISD11

A. Séquence de la protéine ISD11 de souris *in vivo*. **B.** Séquence de la protéine recombinante ISD11 de souris, MM = 10 723,3 Da.

A

```
        10          20          30          40          50          60
MAASSRAQVL DLYRAMMRES KHFSAYNYRM YAVRRIRDAF RENKNVKDPV EIQALVNKAK

        70          80          90
RDLEIIRRQV HIGQLYSTDK LIIENQEKPR T
```

B

```
        10            20            30            40            50            60
AASSRAQVLD    LYRAMMRESK    HFSAYNYRMY    AVRRIRDAFR    ENKNVKDPVE    IQALVNKAKR

        70          80          90
DLEIIRRQVH IGQLYSTDKL IIENQEKPRT
```

Annexe 4. Séquences protéiques d'ISCU WT et ses mutants C35S, C61S, C104S, C104G et M106I

A. Séquence de la protéine de souris ISCU WT *in vivo* avec sa séquence d'adressage à la mitochondrie (vert). **B**. Séquence de la protéine recombinante ISCU WT de souris avant le clivage par la thrombine (avec l'étiquette polyhistidine (bleu) et le site de clivage de la thrombine (violet), MM = 16 424,7 Da) et (**C**) après le clivage par la thrombine, MM = 14 617,8 Da. Séquences des protéines recombinantes de souris ISCU^{C35S} (**D**), ISCU^{C61S} (**E**), ISCU^{C104S} (**F**) (mutation en rouge, MM= 14 601,7 Da), ISCU^{C104G} (**G**) (mutation en rouge, MM = 14 571,7 Da) et ISCU^{M106I} (**H**) (mutation en rouge, MM = 14 599,7 Da) après le clivage par la thrombine.

A

```
        10          20          30          40          50          60
MAAATGAGRL  RRAASALLLR  SPRLPARELS  APARLYHKKV  VDHYENPRNV  GSLDKTSKNV

        70          80          90         100         110         120
GTGLVGAPAC  GDVMKLQIQV  DEKGKIVDAR  FKTFGCGSAI  ASSSLATEWV  KGKTVEEALT

       130                 140                 150                 160
IKNTDIAKEL CLPPVKLHCS MLAEDAIKAA LADYKLKQES KKEEPEKQ
```

B

```
        10          20          30          40          50          60
MGHHHHHHSQ  DLVPRGSYHK  KVVDHYENPR  NVGSLDKTSK  NVGTGLVGAP  ACGDVMKLQI

        70          80          90         100         110         120
QVDEKGKIVD  ARFKTFGCGS  AIASSSLATE  WVKGKTVEEA  LTIKNTDIAK  ELCLPPVKLH

       130                         140                         150
CSMLAEDAIK AALADYKLKQ ESKKEEPEKQ
```

C

```
        10          20          30          40          50          60
GSYHKKVVDH  YENPRNVGSL  DKTSKNVGTG  LVGAPACGDV  MKLQIQVDEK  GKIVDARFKT

        70          80          90         100         110         120
FGCGSAIASS  SLATEWVKGK  TVEEALTIKN  TDIAKELCLP  PVKLHCSMLA  EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

D

```
        10          20          30          40          50          60
GSYHKKVVDH  YENPRNVGSL  DKTSKNVGTG  LVGAPASGDV  MKLQIQVDEK  GKIVDARFKT
```

```
        70            80            90           100           110           120
FGCGSAIASS    SLATEWVKGK    TVEEALTIKN    TDIAKELCLP    PVKLHCSMLA    EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

E

```
        10            20            30            40            50            60
GSYHKKVVDH    YENPRNVGSL    DKTSKNVGTG    LVGAPACGDV    MKLQIQVDEK    GKIVDARFKT

        70            80            90           100           110           120
FGSGSAIASS    SLATEWVKGK    TVEEALTIKN    TDIAKELCLP    PVKLHCSMLA    EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

F

```
        10            20            30            40            50            60
GSYHKKVVDH    YENPRNVGSL    DKTSKNVGTG    LVGAPACGDV    MKLQIQVDEK    GKIVDARFKT

        70            80            90           100           110           120
FGCGSAIASS    SLATEWVKGK    TVEEALTIKN    TDIAKELCLP    PVKLHSSMLA    EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

G

```
        10            20            30            40            50            60
GSYHKKVVDH    YENPRNVGSL    DKTSKNVGTG    LVGAPACGDV    MKLQIQVDEK    GKIVDARFKT

        70            80            90           100           110           120
FGCGSAIASS    SLATEWVKGK    TVEEALTIKN    TDIAKELCLP    PVKLHGSMLA    EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

H

```
        10            20            30            40            50            60
GSYHKKVVDH    YENPRNVGSL    DKTSKNVGTG    LVGAPACGDV    MKLQIQVDEK    GKIVDARFKT

        70            80            90           100           110           120
FGCGSAIASS    SLATEWVKGK    TVEEALTIKN    TDIAKELCLP    PVKLHCSILA    EDAIKAALAD

       130
YKLKQESKKE EPEKQ
```

Annexe 5. Séquences Protéiques de FXN WT et son mutant R162A

A. Séquence de la protéine FXN de souris *in vivo* avec sa séquence d'adressage à la mitochondrie (vert). **B**. Séquence de la protéine recombinante de souris FXN WT (avec l'étiquette polyhistidine (bleu) et le site de clivage par la thrombine (violet)), avant le clivage par la thrombine (MM= 16 217,8 Da) et après le clivage par la thrombine (**C**), MM = 14 410,8 Da. **D**. Séquence de la protéine recombinante de souris de FXN^{R162A} après le clivage par la thrombine (mutation en rouge, MM = 14 325,7 Da).

A

```
      10         20         30         40         50         60
MWAFGGRAAV GLLPRTASRA SAWVGNPRWR EPIVTCGRRG LHVTVNAGAT RHAHLNLHYL

        70         80         90        100        110        120
QILNIKKQSV CVVHLRNLGT LDNPSSLDET AYERLAEETL DSLAEFFEDL ADKPYTLEDY

       130        140        150        160        170        180
DVSFGDGVLT IKLGGDLGTY VINKQTPNKQ IWLSSPSSGP KRYDWTGKNW VYSHDGVSLH

       190        200
ELLARELTKA LNTKLDLSSL AYSGKGT
```

B

```
        10         20         30         40         50         60
MGHHHHHHSQ DLVPRGSGTL DNPSSLDETA YERLAEETLD SLAEFFEDLA DKPYTLEDYD

        70         80         90        100        110        120
VSFGDGVLTI KLGGDLGTYV INKQTPNKQI WLSSPSSGPK RYDWTGKNWV YSHDGVSLHE

       130        140
LLARELTKAL NTKLDLSSLA YSGKGT
```

C

```
        10          20          30          40          50          60
GSGTLDNPSS   LDETAYERLA   EETLDSLAEF   FEDLADKPYT   LEDYDVSFGD   GVLTIKLGGD

        70          80          90         100         110         120
LGTYVINKQT   PNKQIWLSSP   SSGPKRYDWT   GKNWVYSHDG   VSLHELLARE   LTKALNTKLD
```

```
       130
LSSLAYSGKG T
```

D

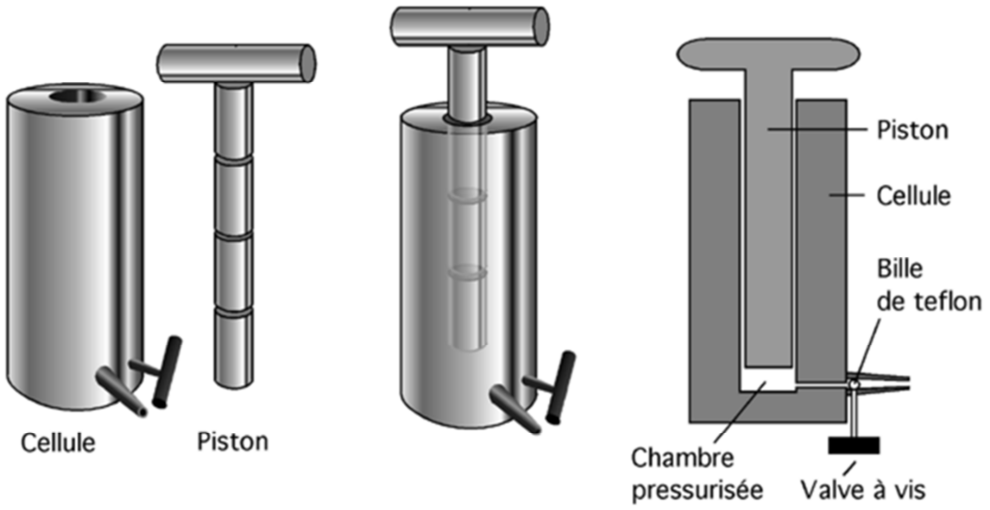
```
        10          20          30          40          50          60
GSGTLDNPSS  LDETAYERLA  EETLDSLAEF  FEDLADKPYT  LEDYDVSFGD  GVLTIKLGGD

        70          80          90         100         110         120
LGTYVINKQT  PNKQIWLSSP  SSGPKAYDWT  GKNWVYSHDG  VSLHELLARE  LTKALNTKLD

       130
LSSLAYSGKG T
```

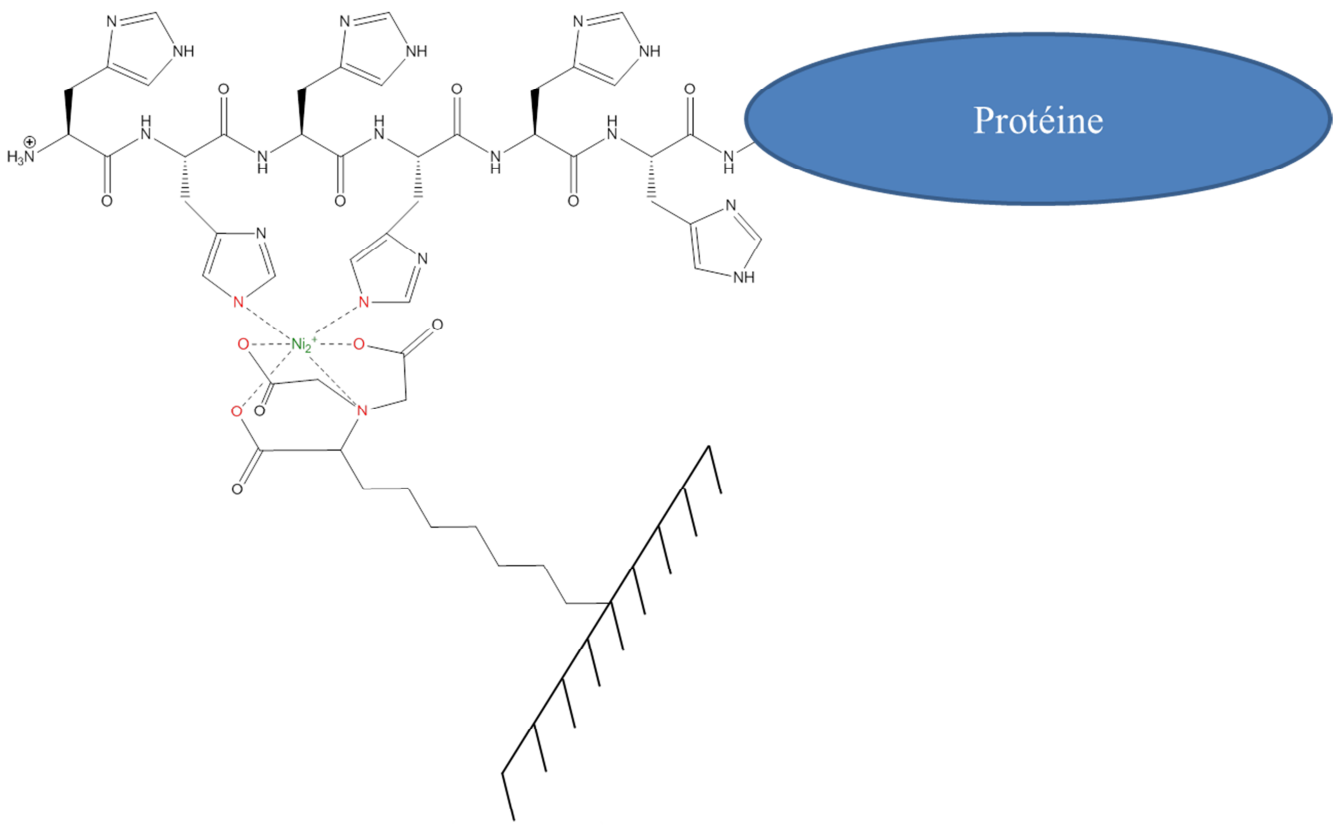
Annexe 6. Principe de la presse de French

Les bactéries en suspension sont versées dans la cellule. La descente progressive du piston va créer une chambre pressurisée. Sous cette pression, les membranes bactériennes cèdent.



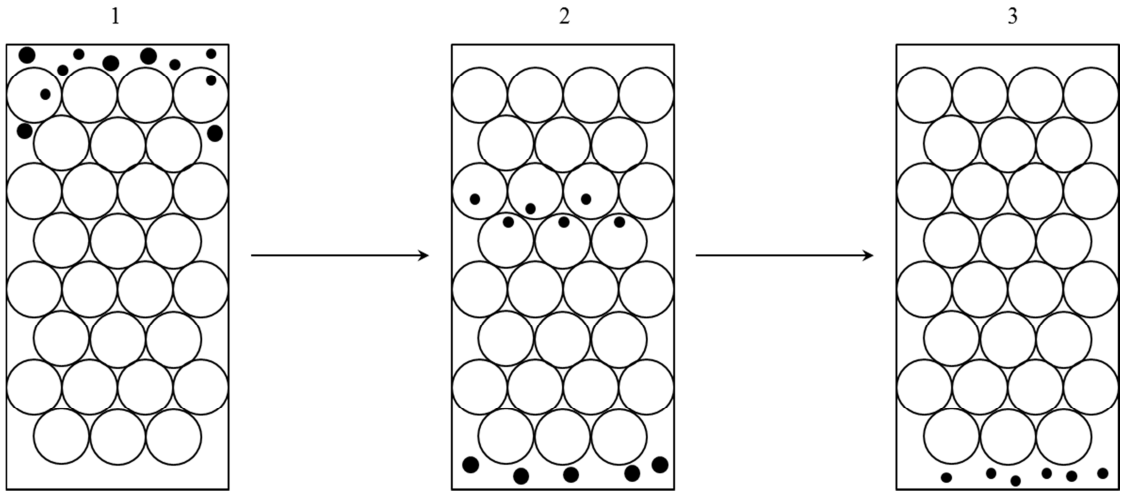
Annexe 7. Principe de la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel

Le principe de cette étape de purification repose sur l'affinité entre les résidus histidines des protéines (en rouge) et l'ion Ni^{2+} (en vert) fixé à la matrice de la colonne via un groupement NTA (Nitrilotriacetic acid, en rouge). L'interaction entre l'ion Ni^{2+} et le NTA se fait par l'intermédiaire de quatre atomes (3 oxygènes et 1 azote) laissant ainsi deux sites de coordination libres. Les protéines possédant une étiquettes poly-histidine se fixent à la colonne tandis que la très grande majorité des protéines de l'extrait brut ne sont pas retenues sur la colonne. Certaines protéines riches en histidine peuvent être retenues au cours de cette étape, et d'autres peuvent être retenues par interactions polaires avec le nickel.



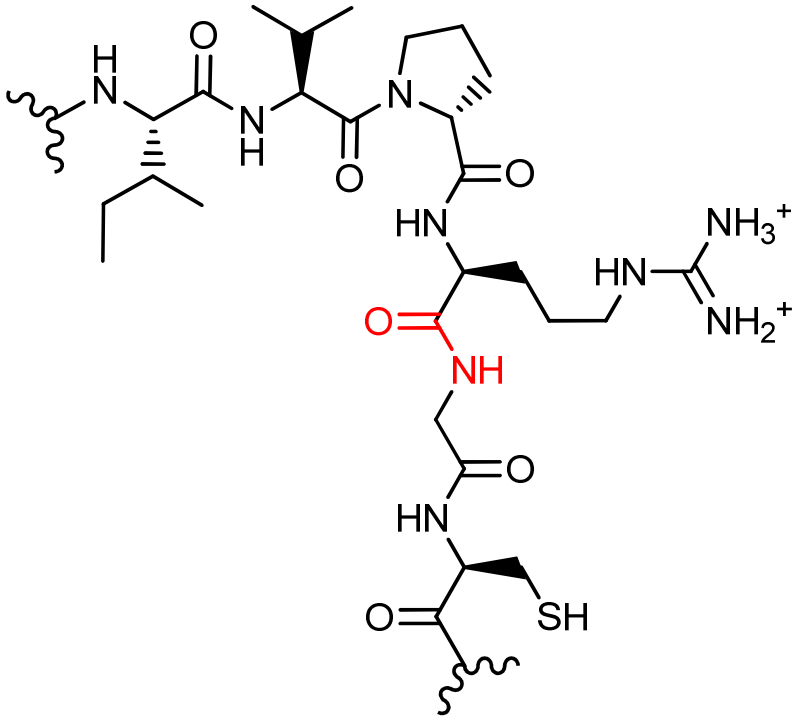
Annexe 8. Principe de la colonne Superdex (75 ou 200)

1. L'échantillon est injecté sur la colonne. 2. Les protéines les plus volumineuses traversent rapidement la colonne et sont éluées en premier alors que les protéines les plus petites (3) sont éluées plus tardivement.



Annexe 9. Structure du site de clivage reconnu par la thrombine

Ce schéma représente la séquence d'acides aminés reconnu par la thrombine : LVPRGS. La liaison peptidique, dessinée en rouge, indique le site de coupure de la thrombine. Cette coupure permet d'éliminer l'étiquette poly-histidine.



Annexe 10. Composition des gels et des tampons pour l'électrophorèse en conditions non-dénaturantes (gel natif)

Les gels polyacrylamides utilisés en conditions natives ont été préparés d'après le tableau suivant (pour 2 gels) :

	Gel de séparation	Gel de concentration
	6,5%	5%
acrylamide/bis-acrylamide 40% (29:1)	2mL	0,5mL
1,5M Tris-base pH 8,8	3mL	--
0,5M Tris-base PpH 6,8	--	1mL
eau ultra pure	7mL	2,5mL
APS 10% w/v	150µL	75µL
TEMED 14,4M	5µL	5µL
Volume final	~ 12mL	~ 4mL

Les échantillons de protéines sont placés dans un tampon de charge composé de 312,5 mM de Tris-base, 0,05 % de bleu de bromophénol et 50 % de glycérol.

La migration des protéines se fait dans un tampon tris-glycine (25 mM Tris-base, 192 mM glycine).

Les protéines sont révélées par la coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie R-250 0,1 % w/v, éthanol 45 % et acide acétique 10 %) puis décoloration dans une solution éthanol 10 %, acide acétique 10 %.

Annexe 11. Composition des gels et des tampons pour l'électrophorèse SDS-PAGE

La composition des gels de polyacrylamide s'est faite d'après le tableau suivant (pour 2 gels) :

	Gel de séparation			Gel de concentration
	8%	10%	14%	5%
acrylamide/bis-acrylamide 40% (29:1)	2mL	2,5mL	4mL	0,5mL
1,5M Tris-base 0,4% SDS pH 8,8	2,5mL	2,5mL	3mL	--
0,5M Tris-base 0,4% SDS PpH 6,8	--	--	--	1mL
eau ultra pure	5,5mL	5mL	5mL	2,5mL
APS 10% w/v	150µL	150µL	150µL	75µL
TEMED 14,4M	5µL	5µL	5µL	5µL
Volume final	~ 10mL	~ 10mL	~ 12mL	~ 4mL

Les échantillons de protéines sont placés dans un tampon de charge composé de 60 mM de Tris, 2 % de SDS, ± 700 mM de β-mercaptoéthanol, 0,1 % de bleu de bromophénol et 25 % de glycérol.

La migration des protéines se fait dans un tampon tris-Glycine (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0,5 % SDS, cuve extérieure) et tris-Tricine (50 mM Tris-base, 50 mM tricine, 0,5 % SDS, cuve intérieure).

Les protéines sont révélées par la coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie R-250 0,1 % w/v, éthanol 45 % et acide acétique 10 %) puis décoloration dans une solution éthanol 10 % et acide acétique 10 %.

Annexe 12. Composition des gels et des tampons pour le Western Blot

La composition des **tampons de transfert** utilisés est décrite dans le tableau suivant (pour 1 L) :

	Tampon de transfert 20% éthanol	Tampon de transfert 10% éthanol
Tampon 20X Tris-base (0,3M), Glycine (2,4M)	50mL	50mL
Ethanol 96%	200mL	100mL
Eau ultra pure	750mL	850mL

Le tampon de transfert à 20 % d'éthanol est utilisé pour transférer les protéines séparées sur un gel de polyacrylamide 14 %, alors que le tampon de transfert à 10 % d'éthanol est utilisé pour transférer les protéines séparées sur un gel polyacrylamide 8 % ou 10 %.

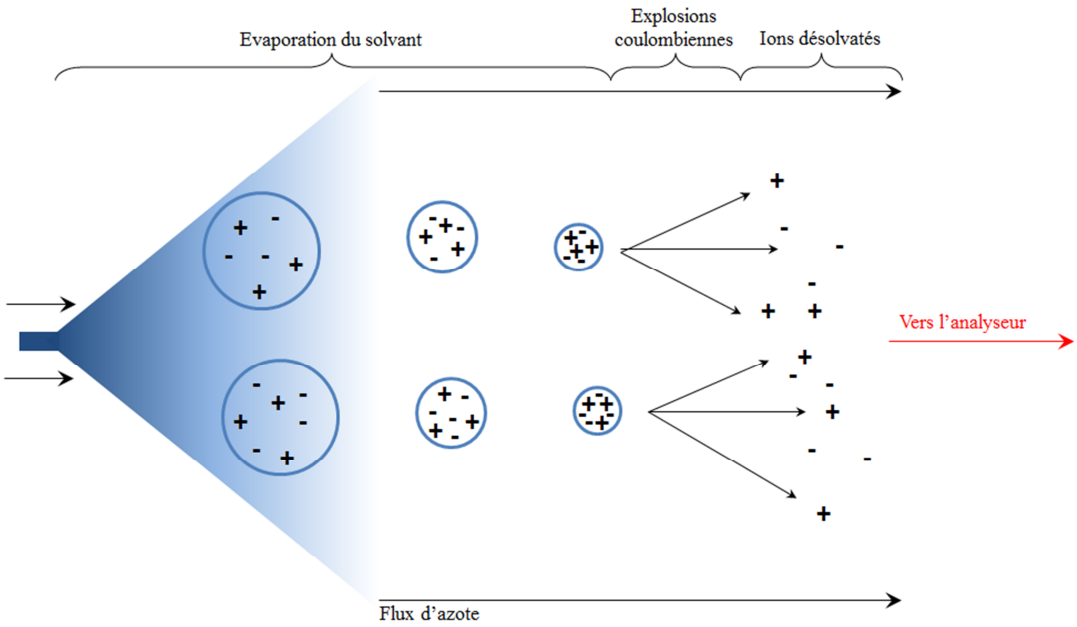
Les **anticorps primaires** utilisés sont pour ISCU : anticorps de lapin de chez ProteinTech (14812-1-AP) et pour FXN : anticorps de souris de chez ABCAM (ab113691)

Les **anticorps secondaires** utilisés sont : IRDye® 800CW et IRDye® 680 (Eurobio).

Les protéines d'intérêt sont révélées grâce à l'utilisation du système d'imagerie infrarouge Odyssey® (Li-Cor).

Annexe 13. Principe du spectromètre de masse ESI-Q/TOF

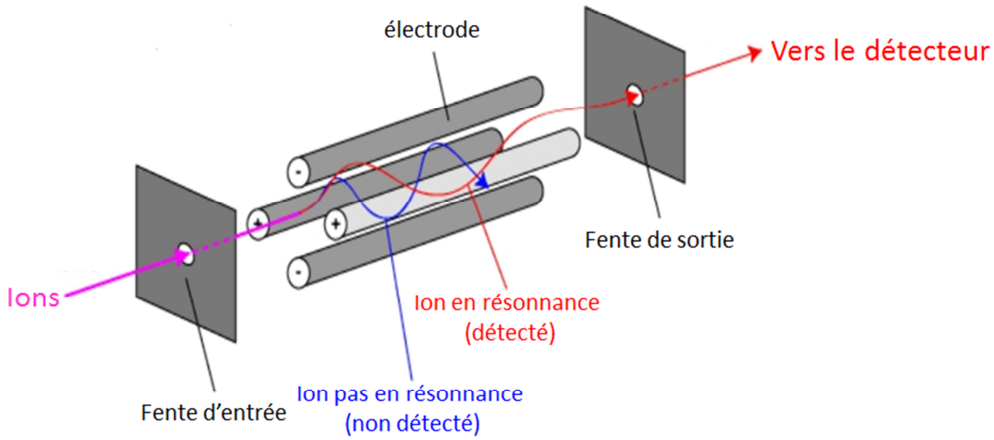
La source d'ionisation utilisée est **l'ionisation par électrospray** (ESI, electrospray ionisation). Ce principe d'ionisation se réalise à pression atmosphérique ; c'est également une méthode d'ionisation douce. En effet, elle évite la fragmentation de la protéine et permet ainsi une analyse de la protéine entière. Cette technique d'ionisation peut être utilisée en mode positif (ion moléculaire détecté $[M+nH]^{n+}$) ou en mode négatif (ion moléculaire détecté $[M-nH]^{n-}$).



La technique d'électrospray permet d'obtenir des ions protéiques en phase gazeuse à partir d'ions protéiques en solution. L'échantillon protéique est introduit dans un capillaire (75 à 150 µmètre) en présence d'un solvant volatil (acide formique et acétonitrile). Ce mélange protéique est nébulisé en présence d'un potentiel élevé (3 à 4 kV) sous un flux d'azote. La solution protéique va alors se décomposer en gouttelettes hautement chargées. A l'aide du flux d'azote, le solvant va peu à peu s'évaporer. Cette évaporation progressive conduit alors à une cascade d'explosions coulombiennes, c'est-à-dire, une division spontanée des gouttelettes chargées en gouttelettes plus petites, provoquée par une charge surfacique très élevée. Les ions désolvatés se dirigent ensuite vers l'analyseur.

Dans un premier temps, les ions désolvatés vont passer au travers d'un **analyseur quadripolaire**. Ce quadripôle (Q ou quadrupôle) est composé de quatre électrodes, généralement cylindriques, parfaitement parallèles. Les électrodes sont soumises deux à deux

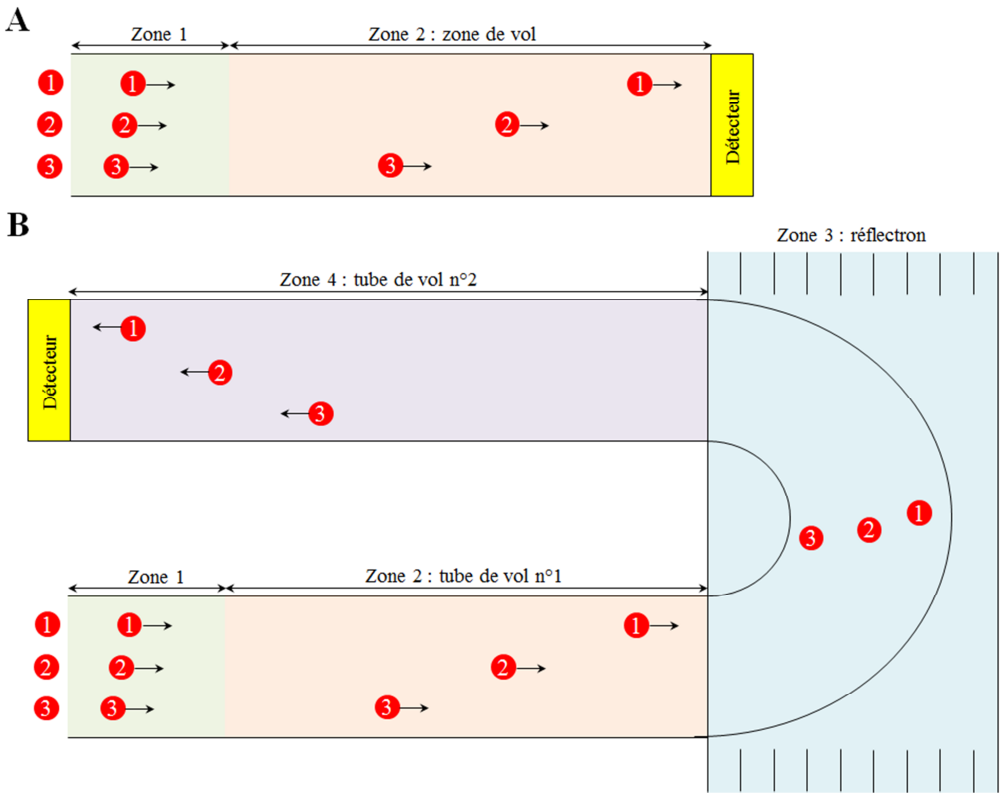
à un potentiel ±Φ composé d'une tension continue, U et d'une tension alternative, V. En appliquant cette différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes, un champ électrique quadripolaire se crée. Ce champ électrique permet de séparer les ions selon leur masse et leur charge (rapport *m/z*). Selon les valeurs des tensions U et V, certains ions vont avoir une trajectoire stable, traverser le quadripôle et être détectés ; d'autres auront une trajectoire instable et vont se décharger sur les électrodes. Ainsi, un ion positif sera attiré vers une électrode négative (et inversement) ; si le potentiel de cette électrode change avant que l'ion ne se soit déchargé sur elle, il changera alors de direction et entrera en résonnance : il va ainsi traverser l'analyseur.



Dans un second temps, les ions, passés au travers du quadripôle, vont circuler dans un nouvel analyseur : l'**analyseur à « temps de vol »** (TOF, time of flight). Le principe de cette méthode repose sur la mesure du temps que mettent les ions pour parcourir une distance donnée. Les ions sont accélérés par un champ électrique et « volent » d'autant plus vite qu'ils sont légers. Le temps initial correspond à l'entrée des ions dans l'analyseur TOF et le temps final correspond à l'arrivé sur le détecteur.

L'appareil se divise en deux zones (**A**). La première est soumise à une tension d'accélération entrainant l'apparition d'un champ électrique. Ce champ électrique va permettre l'accélération des ions vers la seconde zone. Au sein de la première zone, les ions acquièrent une énergie cinétique qui sera la même pour les ions de même charge. La seconde zone est nommée « zone de vol » ou « zone de champ libre ». Ces termes signifient que cette

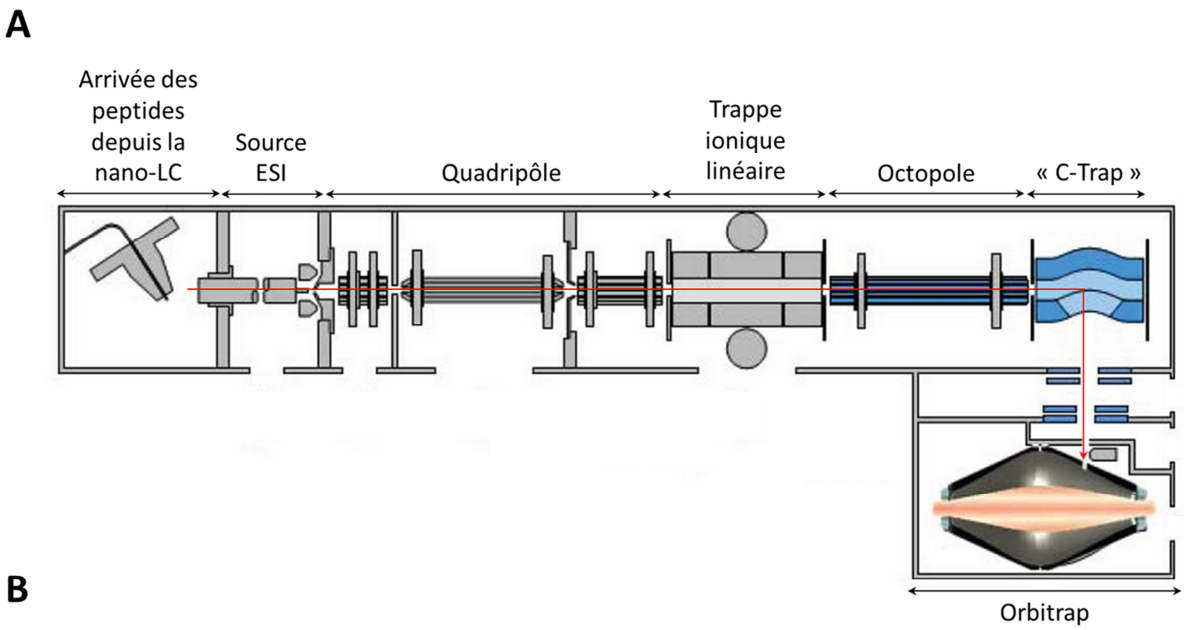
partie de l'appareil est sans tension. Les ions traversent cette zone pour arriver jusqu'au détecteur. Leur vitesse va dépendre de leur rapport *m/z*.

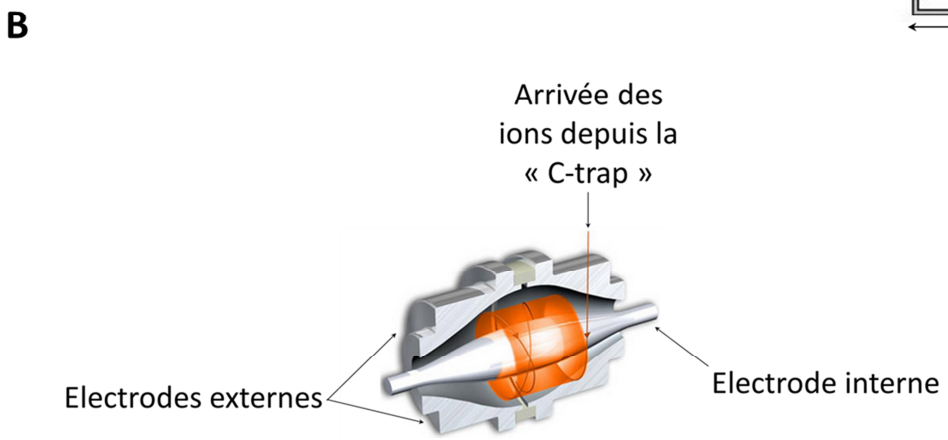


Les analyseurs TOF en mode linéaire ont un inconvénient principal : deux ions dotés du même rapport *m/z*, mais d'énergie cinétique différente, peuvent avoir des temps de vol différents et donc arriver à deux instants différents sur le détecteur. Pour pallier à ce problème, la plupart des analyseurs TOF sont équipés d'un mode « réflectron ». Ce mode réflectron (**B**) permet la correction de la dispersion des temps d'arrivée au détecteur. Un champ électrique décélérateur et réflecteur règne au sein du réflectron. Il agit comme un miroir électrostatique pour réfléchir les ions vers le second tube de vol en direction du détecteur. Les ions avec des énergies cinétiques élevées iront plus loin dans le réflecteur, ce qui augmente la longueur effective de l'analyseur par rapport à ceux d'énergie cinétique plus faible. A *m/z* égal, les ions arriveront au même moment au détecteur.

Annexe 14. Principe de fonctionnement du LTQ-Orbitrap

A. Schéma complet de l'appareil avec, tracé en rouge, le parcours effectués par les ions. **B**. Schéma du système de l'Orbitrap.





Annexe 15. Identification de la cystéine persulfurée de NFS1 dans le complexe NIUF

A. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide DVALSSGSACTSASLEPSYVLR. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments des peptides DVALSSGSACTSASLEPSYVLR contenant les modifications "C-Scam" et "C-S-Scam". Les annotations b+ et y+ représentes les masses obtenues pour la fragmentation successive des liaisons peptidiques de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide C-S-Scam. Deux peptides ont été sélectionnés avec des masses égales à 2269,09135 uma et 2301,0623 uma correspondant au peptide DVALSSGSACTSASLEPSYVLR (contenant la cystéine C383 de NFS1) avec une carbamidométhylation sur la cystéine C383 (C-Scam) et une carbamidométhylation sur la cystéine C383 persulfurée (C-S-Scam). La différence de masse entre ces deux peptides (31,97095) est cohérente avec l'ajout d'un atome de soufre (31,97211) et non pas avec l'ajout de deux atomes d'oxygène (31,9898).

A

	C-Scam	C-S-Scam		C-Scam	C-S-Scam	
N°	b+	b+	**Séquence**	y+	y+	N°
1	116.03423	116.03423	D			22
2	215.10265	215.10265	V	2155.07005	2187.04212	21
3	286.13977	286.13977	A	2056.00163	2087.97370	20
4	399.22384	399.22384	L	1984.96451	2016.93658	19
5	486.25587	486.25587	S	1871.88044	1903.85251	18
6	573.28790	573.28790	S	1784.84841	1816.82048	17
7	630.30937	630.30937	G	1697.81638	1729.78845	16
8	717.34140	717.34140	S	1640.79491	1672.76698	15
9	788.37852	788.37852	A	1553.76288	1585.73495	14
10	948.40917	980.38124	C	1482.72576	1514.69783	13
11	1049.45685	1081.42892	T	1322.69510	1322.69510	12
12	1136.48888	1168.46095	S	1221.64742	1221.64742	11
13	1207.52600	1239.49807	A	1134.61539	1134.61539	10
14	1294.55803	1326.53010	S	1063.57827	1063.57827	9
15	1407.64210	1439.61417	L	976.54624	976.54624	8
16	1536.68470	1568.65677	E	863.46217	863.46217	7
17	1633.73747	1665.70954	P	734.41957	734.41957	6
18	1720.76950	1752.74157	S	637.36680	637.36680	5
19	1883.83282	1915.80489	Y	550.33477	550.33477	4
20	1982.90124	2014.87331	V	387.27145	387.27145	3
21	2095.98531	2127.95738	L	288.20303	288.20303	2
22			R	175.11896	175.11896	1

Annexe 16. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIU

A. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide NVGTGLVGAPACGDVMK. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments des peptides NVGTGLVGAPACGDVMK contenant les modifications "C-Scam" et "C-S-Scam". Les annotations b+ et y+ représentes les masses obtenues pour la fragmentation successive des liaisons peptidiques de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide C-S-Scam. Deux peptides ont été sélectionnés avec des masses égales à 1644,79569 uma et 1676,76811 uma correspondant au peptide NVGTGLVGAPACGDVMK (contenant la cystéine C35 d'ISCU) avec une carbamidométhylation sur la cystéine C35 (C-Scam) et une carbamidométhylation sur la cystéine C35 persulfurée (C-S-Scam). La différence de masse entre ces deux peptides (31,97242) est cohérente avec l'ajout d'un atome de soufre (31,97211) et non pas avec l'ajout de deux atomes d'oxygène (31,9898).

A

	C-Scam	C-S-Scam		C-Scam	C-S-Scam	
N°	b+	b+	**Séquence**	y+	y+	N°
1	115.05021	115.05021	N			22
2	214.11863	214.11863	V	1531.76082	1563.73289	21
3	271.14010	271.14010	G	1432.69240	1464.66447	20
4	372.18778	372.18778	T	1375.67093	1407.64300	19
5	429.20925	429.20925	G	1274.62325	1306.59532	18
6	542.29332	542.29332	L	1217.60178	1249.57385	17
7	641.36174	641.36174	V	1104.51771	1136.48978	16
8	698.38321	698.38321	G	1005.44929	1037.42136	15
9	769.42033	769.42033	A	948.42782	980.39989	14
10	866.47310	866.47310	P	877.39070	909.36277	13
11	937.51022	937.51022	A	780.33793	812.31000	12
12	1097.54087	1129.51294	C	709.30081	741.27288	11
13	1154.56234	1186.53441	G	549.27015	549.27015	10
14	1269.58929	1301.56136	D	492.24868	492.24868	9
15	1368.65771	1400.62978	V	377.22173	377.22173	8
16	1499.69821	1531.67028	M	278.15331	278.15331	7
17			K	147.11281	147.11281	6

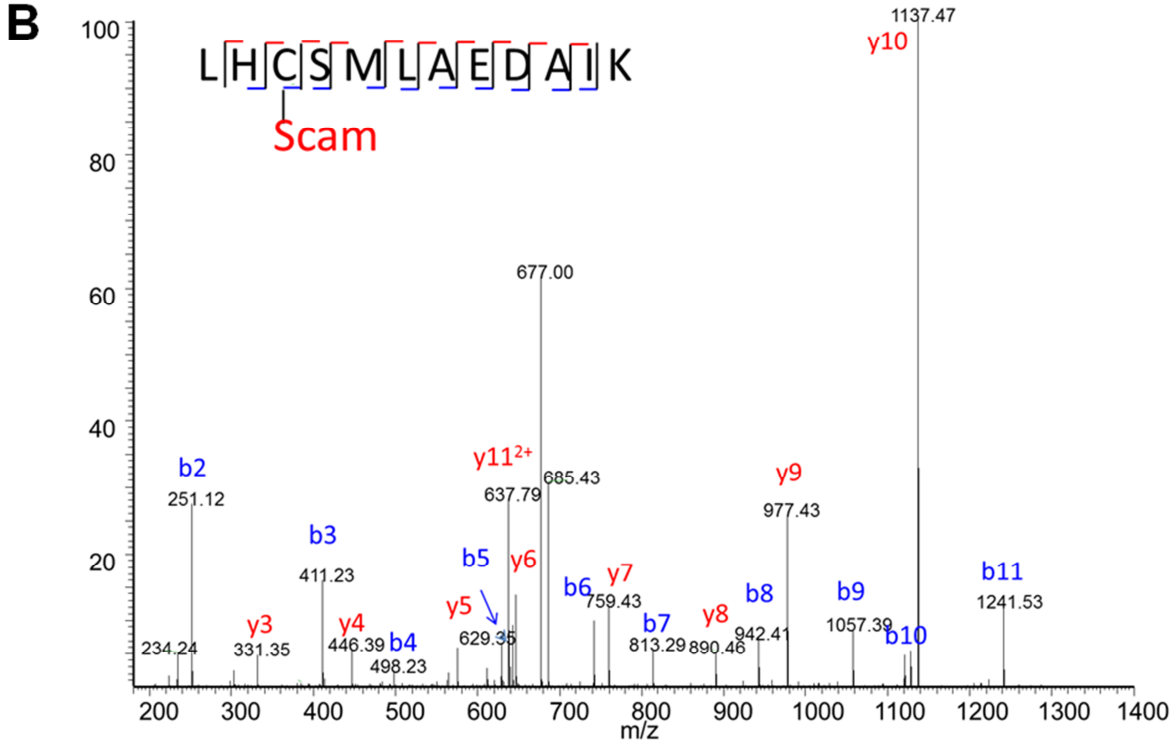
Annexe 17. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIU

A. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide LHCSMLAEDAIK. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments des peptides LHCSMLAEDAIK contenant les modifications "C-Scam" et "C-S-Scam". Les annotations b+ et y+ représentes les masses obtenues pour la fragmentation successive des liaisons peptidiques de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide C-S-Scam. Deux peptides ont été sélectionnés avec des masses égales à 1386,66313 uma et 1418,63627 uma correspondant au peptide LHCSMLAEDAIK (contenant la cystéine C104 d'ISCU) avec une carbamidométhylation sur la cystéine C104 (C-Scam) et une carbamidométhylation sur la cystéine C104 persulfurée (C-S-Scam). La différence de masse entre ces deux peptides (31,97314) est cohérente avec l'ajout d'un atome de soufre (31,97211) et non pas avec l'ajout de deux atomes d'oxygène (31,9898).

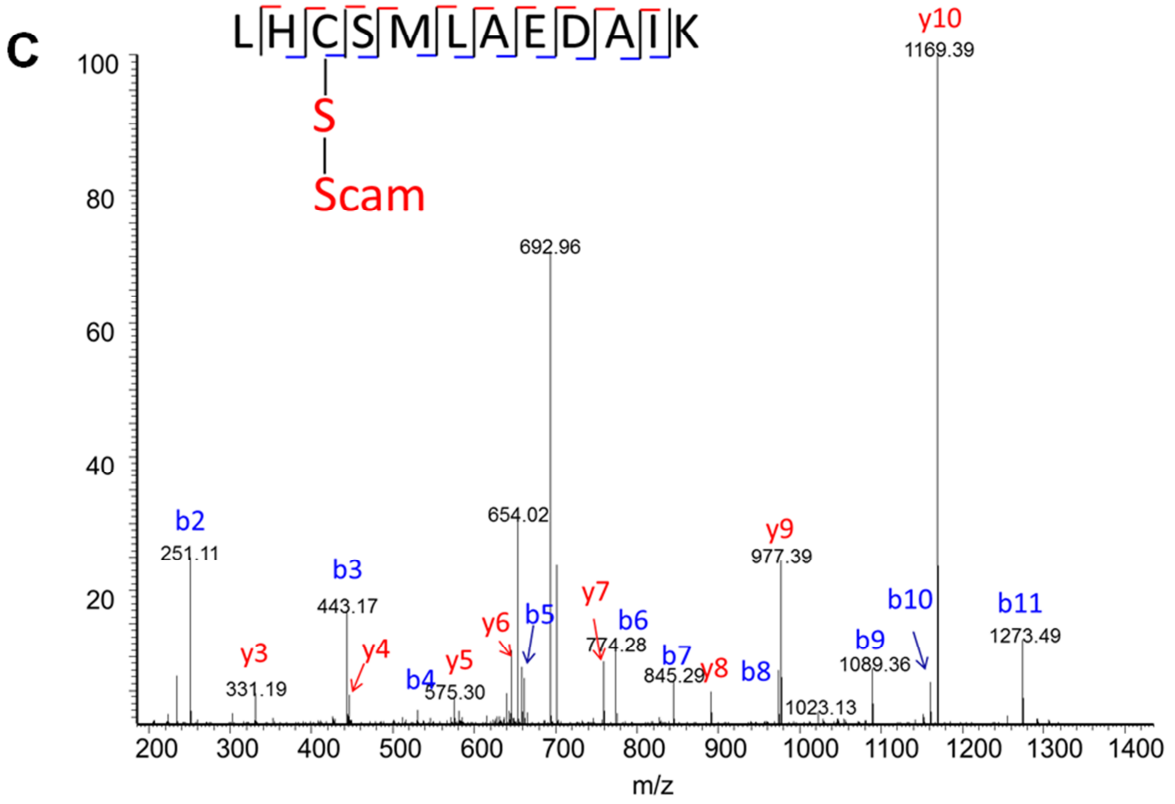
A

	C-Scam	C-S-Scam		C-Scam	C-S-Scam	
N°	b+	b+	**Séquence**	y+	y+	N°
	114,09		**L**			12
2	251,15	251,15	**H**	1274,58	1306,53	11
3	411,18	443,15	**C**	1137,53	1169,47	10
4	498,22	530,18	**S**	977,5	977,5	9
5	629,25	661,22	**M**	890,47	890,47	8
6	742,33	774,31	**L**	759,42	759,42	7
7	813,37	845,35	**A**	646,34	646,34	6
8	942,41	974,39	**E**	575,3	575,3	5
9	1057,44	1089,42	**D**	446,26	446,26	4
10	1128,48	1160,45	**A**	331,23	331,23	3
11	1241,56	1273,54	**I**	260,2	260,2	2
12			**K**		147,11	

B


LHCSMLAEDAIK
Scam
1137.47
y10
677.00
y11 2+
637.79
685.43
y9
977.43
b2
251.12
b3
411.23
b5
y6
b6
759.43
y7
y5
629.35
b7
813.29
y8
890.46
b8
942.41
b9
1057.39
b10
b11
1241.53
y3
331.35
y4
446.39
b4
498.23
234.24
100
80
60
40
20
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
m/z

C


LHCSMLAEDAIK
S
Scam
y10
1169.39
692.96
654.02
y9
977.39
b2
251.11
b3
443.17
y7
y6
b5
b6
774.28
b10
b11
1273.49
b9
1089.36
b7
845.29
y8
b8
1023.13
y3
331.19
y4
y5
b4
375.30
100
80
60
40
20
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
m/z

Annexe 18. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF

A. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide NVGTGLVGAPACGDVMK. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments des peptides NVGTGLVGAPACGDVMK contenant les modifications "C-Scam" et "C-S-Scam". Les annotations b+ et y+ représentes les masses obtenues pour la fragmentation successive des liaisons peptidiques de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide C-S-Scam. Deux peptides ont été sélectionnés avec des masses égales à 1644,7966 uma et 1676,768 uma correspondant au peptide NVGTGLVGAPACGDVMK (contenant la cystéine C35 d'ISCU) avec une carbamidométhylation sur la cystéine C35 (C-Scam) et une carbamidométhylation sur la cystéine C35 persulfurée (C-S-Scam). La différence de masse entre ces deux peptides (31,9714) est cohérente avec l'ajout d'un atome de soufre (31,97211) et non pas avec l'ajout de deux atomes d'oxygène (31,9898).

A

	C-Scam	C-S-Scam		C-Scam	C-S-Scam	
N°	b+	b+	**Séquence**	y+	y+	N°
1	115.05021	115.05021	N			17
2	214.11863	214.11863	V	1531.76082	1563.73289	16
3	271.14010	271.14010	G	1432.69240	1464.66447	15
4	372.18778	372.18778	T	1375.67093	1407.64300	14
5	429.20925	429.20925	G	1274.62325	1306.59532	13
6	542.29332	542.29332	L	1217.60178	1249.57385	12
7	641.36174	641.36174	V	1104.51771	1136.48978	11
8	698.38321	698.38321	G	1005.44929	1037.42136	10
9	769.42033	769.42033	A	948.42782	980.39989	9
10	866.47310	866.47310	P	877.39070	909.36277	8
11	937.51022	937.51022	A	780.33793	812.31000	7
12	1097.54087	1129.51294	C	709.30081	741.27288	6
13	1154.56234	1186.53441	G	549.27015	549.27015	5
14	1269.58929	1301.56136	D	492.24868	492.24868	4
15	1368.65771	1400.62978	V	377.22173	377.22173	3
16	1499.69821	1531.67028	M	278.15331	278.15331	2
17			K	147.11281	147.11281	1

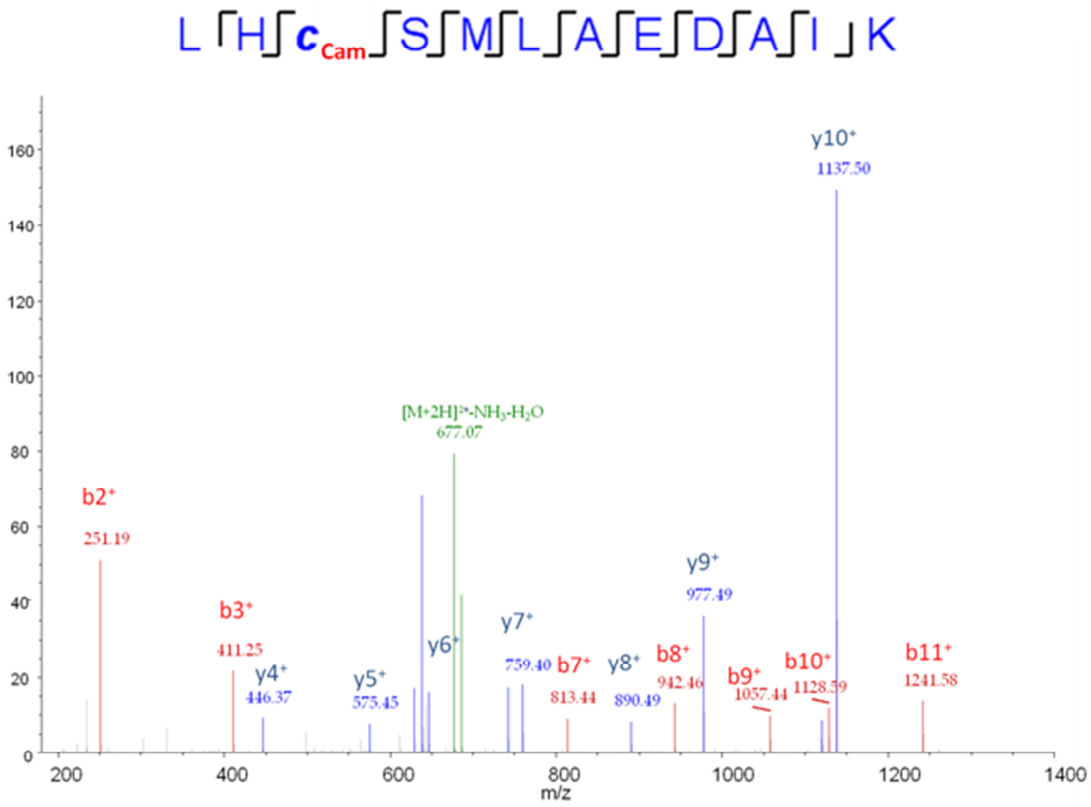
Annexe 19. Identification de la cystéine persulfurée d'ISCU dans le complexe NIUF

A. Résumé des valeurs obtenues par l'analyse ORBITRAP-MS/MS pour le peptide LHCSMLAEDAIK. Le tableau liste les masses attendues par l'analyse MS/MS des fragments des peptides LHCSMLAEDAIK contenant les modifications "C-Scam" et "C-S-Scam". Les annotations b+ et y+ représentes les masses obtenues pour la fragmentation successive des liaisons peptidiques de N vers C-terminal et de C vers N-terminal, respectivement. Les nombres bleus et rouges correspondent aux masses des fragments peptidiques détectées par l'analyse MS/MS présentée en **B** et **C**. Les nombres soulignés sont spécifiques du peptide C-S-Scam. Analyse ORBITRAP-MS/MS du peptide LHCSMLAEDAIK dans le complexe NIUF avant (**B**) et après (**C**) réaction avec la L-cystéine.

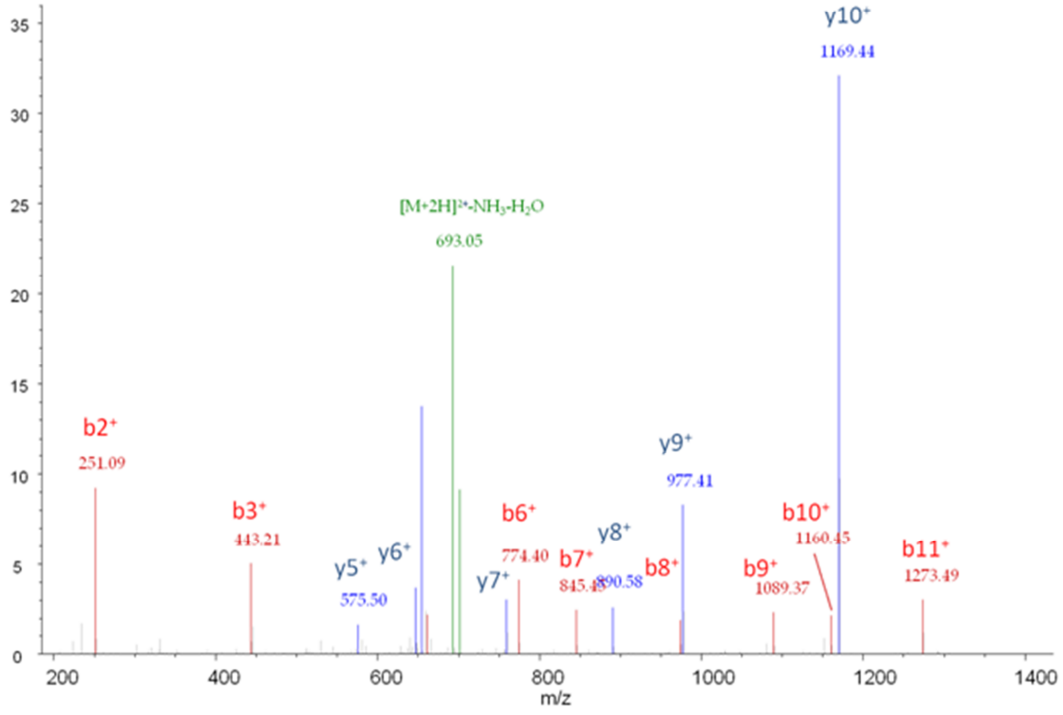
A

	C-Scam	C-S-Scam		C-Scam	C-S-Scam	
N°	b+	b+	**Séquence**	y+	y+	N°
	114.091	114.09135	**L**			12
2	251.150	251.15026	**H**	1274.586	1306.559	11
3	411.180	443.15298	**C**	1137.527	1169.500	10
4	498.213	530.18501	**S**	977.497	977.497	9
5	629.253	661.22551	**M**	890.465	890.465	8
6	742.337	774.30958	**L**	759.424	759.425	7
7	813.374	845.34670	**A**	646.340	646.341	6
8	942.417	974.38930	**E**	575.303	575.304	5
9	1057.444	1089.41625	**D**	446.260	446.261	4
10	1128.481	1160.45337	**A**	331.234	331.234	3
11	1241.565	1273.53744	**I**	260.1969	260.197	2
12	114.091	114.09135	**K**	147.113	147.113	

B


L H cCam S M L A E D A I K
y10+
1137.50
[M+2H]2+-NH3-H2O
677.07
b2+
251.19
y9+
977.49
b3+
411.25
y7+
759.40
y6+
y4+
446.37
y5+
575.45
b7+
813.44
y8+
890.49
b8+
942.46
b9+
1057.44
b10+
1128.59
b11+
1241.58
m/z

C


L H cSCam S M L A E D A I K
y10+
1169.44
[M+2H]2+-NH3-H2O
693.05
b2+
251.09
y9+
977.41
b3+
443.21
b6+
774.40
y8+
y6+
y5+
575.50
y7+
b7+
845.48
890.58
b8+
b10+
1160.45
b9+
1089.37
b11+
1273.49
m/z

Annexe 20. Constante de vitesse, k_{R1}, de réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine

Résumé des valeurs obtenues pour les constantes de vitesse, k_{R1}, de réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine dans les complexes NI, NIU et NIUF, et dans le mélange NI + F. Chaque valeur a été calculée à partir des activités cystéine désulfurase (Cf. **Figure IV. 22**, **C** et **Figure V. 13**, **A**)

	Réducteurs	k_{R1} ($M^{-1}.s^{-1}$)
NI	L-cystéine	6,1 ± 0,5
NI + F	L-cystéine	6,2 ± 0,5
NIU	L-cystéine	1,2 ± 0,2
NIUF	L-cystéine	7,1 ± 0,5

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 14 Jun 2014 | Accepted 28 Oct 2014 | Published xx xxx 2015

DOI: 10.1038/ncomms6686

Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols

Aubérie Parent[1], Xavier Elduque[2], David Cornu[3], Laura Belot[1], Jean-Pierre Le Caer[1], Anna Grandas[2], Michel B. Toledano[4] & Benoit D'Autréaux[1]

Friedreich's ataxia is a severe neurodegenerative disease caused by the decreased expression of frataxin, a mitochondrial protein that stimulates iron–sulfur (Fe-S) cluster biogenesis. In mammals, the primary steps of Fe-S cluster assembly are performed by the NFS1–ISD11–ISCU complex via the formation of a persulfide intermediate on NFS1. Here we show that frataxin modulates the reactivity of NFS1 persulfide with thiols. We use maleimide-peptide compounds along with mass spectrometry to probe cysteine-persulfide in NFS1 and ISCU. Our data reveal that in the presence of ISCU, frataxin enhances the rate of two similar reactions on NFS1 persulfide: sulfur transfer to ISCU leading to the accumulation of a persulfide on the cysteine C104 of ISCU, and sulfur transfer to small thiols such as DTT, L-cysteine and GSH leading to persulfuration of these thiols and ultimately sulfide release. These data raise important questions on the physiological mechanism of Fe-S cluster assembly and point to a unique function of frataxin as an enhancer of sulfur transfer within the NFS1–ISD11–ISCU complex.

[1] Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR2301, Centre de Recherche de Gif, Centre National de la Recherche Scientifique, 1 avenue de la terrasse, 91191 Gif Sur Yvette, France. [2] Departament de Química Orgànica i IBUB, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Marti i Franques 1-11, E-08028 Barcelona, Spain. [3] Plateforme IMAGIF, Centre de Recherche de Gif, Centre National de la Recherche Scientifique, 1 avenue de le terrasse, 91191 Gif Sur Yvette, France. [4] Laboratoire Stress Oxydant et Cancer, Service de Biologie Intégrative et de Génétique Moléculaire, Institut de Biologie et de Technologie de Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, F-91191 Gif Sur Yvette, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.D'.A. (email: benoit.dautreaux@cnrs.fr).

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Friedreich's ataxia is a severe neurodegenerative disease caused by the reduced expression of the small globular mitochondrial protein, frataxin (FXN)[1]. In patients and various models of Friedreich's ataxia, Fe-S cluster biogenesis and iron metabolism are impaired[2,3]. Initial studies on eukaryotic and prokaryotic FXNs suggested roles in iron storage[4], delivery[5] and detoxification[6], but the physiological relevance of these functions has been questioned[7–10]. Recent studies instead point to a direct role of FXN in Fe-S cluster assembly[11–14]. Fe-S clusters are essential prosthetic groups of proteins operating a wide range of functions from enzymatic catalysis, electron transfer to oxidative and nitrosative stress sensing[15,16]. In eukaryotes, Fe-S cluster-containing proteins are distributed in almost every cellular compartment, especially in mitochondria, the cytosol and the nucleus[16]. The biogenesis of Fe-S clusters is performed by two main multi-protein machineries, the ISC (Iron–Sulfur Cluster) machinery localized in mitochondria and the CIA (Cytosolic Iron–sulfur cluster Assembly) machinery localized in the cytosol[16]. The ISC machinery provides Fe-S clusters for mitochondrial proteins and also synthesizes an unknown compound that is exported to the cytosol and required for assembly of Fe-S clusters by the CIA machinery[17–19].

The ISC machinery comprises ISCU, a scaffold protein on which Fe-S clusters are assembled, NFS1, a pyridoxal phosphate-dependent cysteine desulfurase, ISD11 and FXN[20–23]. The eukaryotic ISC machinery has evolved from bacteria and thus some of the primary steps of Fe-S cluster assembly have been conserved[16,24,25]. As a common strategy, nascent Fe-S clusters are assembled on ISCU from iron and sulfide and transferred to recipient apo-proteins with the assistance of other specialized proteins. The sulfide ions are provided to ISCU in the form of a persulfide intermediate on the catalytic cysteine C383 of NFS1 (NFS1-SSH, where the terminal sulfur is also called sulfane sulfur) by desulfurization of L-cysteine. ISD11 is proposed to stabilize NFS1 and also to promote formation of persulfide on NFS1 (refs 12,26,27). In the bacterial system, the sulfane sulfur of the persulfide carried by IscS, the homologue of NFS1, is transferred to IscU by a *trans*-persulfuration process leading to poly-persulfurated IscU[28–30]. A similar *trans*-persulfuration process has been recently decribed with the mammalian system[31]. Unfortunately, mechanistic details of the subsequent steps leading to Fe-S cluster assembly are still lacking.

Mammalian FXN was proposed to stimulate the rate of Fe-S cluster assembly by enhancing sulfide production via binding to the NFS1–ISD11–ISCU complex[11,14,32]. This stimulatory effect was dependent on the presence of ISCU and ultimately favoured the assembly of [4Fe4S] clusters at the expense of [2Fe2S] clusters[11]. In yeast, the homologue of FXN, Yfh1, was proposed to stimulate the formation of persulfide on Nfs1 by increasing the affinity of L-cysteine for Nfs1 (ref. 12). Intriguingly, and in stark contrast to the mammalian system, this effect of Yfh1 was independent of the presence of ISCU. In bacteria, CyaY, the homologue of eukaryotic FXN, was shown to slow down rather than stimulate Fe-S assembly on the IscS–IscU complex[33] and did not alter the [2Fe2S]:[4Fe4S] cluster ratio[34]. These contrasting data raise important questions concerning the molecular function of FXN, (both in bacteria and mammals), and the mechanism by which FXN stimulates sulfide production and the rates of Fe-S cluster assembly.

To determine the mechanism by which mammalian FXN stimulates Fe-S cluster assembly, we here develop a novel assay to probe protein persulfide that makes use of sulfur-reactive maleimide-peptide compounds. Along with mass spectrometry analysis, the maleimide-peptide assays reveal that the sulfane sulfur of NFS1 is directly and spontaneously transferred to ISCU leading to the accumulation of a persulfide on its cysteine C104. The single-turnover kinetics of formation, reduction and transfer of persulfide, monitored using the maleimide-peptide assay, provide evidence that FXN is not required for persulfide formation on NFS1, but enhances the rate of sulfur transfer to ISCU and cleavage of NFS1 persulfide by external thiols such as L-cysteine and glutathione (GSH), which leads to sulfur transfer on these thiols and ultimately sulfide release. In contrast, FXN does not impact ISCU persulfide reduction. We also show that NFS1 persulfide reduction by thiols is the rate-limiting step in multiple-turnover kinetics and that ISCU persulfide is not reduced under these conditions and thus does not contribute to sulfide release. Thereby, FXN stimulates sulfide release exclusively by enhancing the rate of NFS1 persulfide reduction by thiols. However, this pathway is not efficient for Fe-S cluster assembly on ISCU. These data shed new light on the molecular function of mammalian FXN within the ISC machinery and raise questions on the physiological mechanism of Fe-S cluster assembly.

Results

FXN is not required for NFS1 persulfide formation. In mammals, the global rate of sulfide production is enhanced by FXN and decreased by ISCU when thiols are used as reductants[11,14], but a step-by-step characterization of the effects of FXN and ISCU on the catalytic cycle of NFS1 is still lacking (Fig. 1a). To monitor the formation and reduction of NFS1 persulfide independently, we developed a new assay enabling the detection and quantification of persulfide. This assay is based on the chemical properties of the persulfide group, which contains both a terminal sulfur amenable to alkylation by maleimide compounds and a disulfide bond that can be cleaved by reduction (Fig. 1b). In brief, a persulfide is revealed by the loss of the succinimide-peptide moiety (the product of maleimide reaction with a sulfhydryl) upon cleavage of the sulfur–sulfur bond by dithiothreitol (DTT). To visualize the loss of the succinimide moiety, we engineered maleimide compounds with a peptide arm (maleimide-peptide, MalP) of a size sufficiently large to be detected by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The best results were obtained with a 16-mer MalP ($MalP_{16}$: 1.95 kDa) (Fig. 1c). In the absence of L-cysteine (the substrate of NFS1), the seven cysteines of NFS1 were alkylated by $MalP_{16}$ (denoted NFS1 + 7 species) and no loss of the succinimide-peptide moiety was observed upon reduction by DTT, indicating that none of NFS1 cysteines was initially persulfurated (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1a). Following reaction with L-cysteine, the seven cysteines of NFS1 were still alkylated by $MalP_{16}$ but reduction by DTT led to the loss of one succinimide-peptide moiety from the NFS1 + 7 species leading to formation of an NFS1 + 6 species, thereby indicating the presence of a persulfide group on a single cysteine of NFS1 (Fig. 1d).

In a first set of experiments, we monitored the influences of ISCU (U) and FXN (F) on the rates of persulfide formation (reaction 1, Fig. 1a) by the NFS1–ISD11 complex (NI). The NFS1–ISD11 complex (NI), ISCU (U) and FXN (F) have been shown to form homodimeric ternary and quaternary complexes with NI:U and NI:U:F stoichiometries of 1:1 and 1:1:1 for each subunit, respectively[11,14,23], which will be denoted NIU and NIUF thereafter. We confirmed here by size exclusion chromatography that when incubated together, these proteins form the NIU and NIUF complex and that FXN does no interact with the NI complex in the absence of ISCU (Supplementary Fig. 2a–e). However, by using 100 μM of the NI complex and five equivalents of FXN, only a small proportion of FXN was detected as an NIUF complex, which questioned the efficiency of complex formation at these concentrations. To determine the optimal protein concentration for NIU and NIUF complexes formation, we titrated the

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

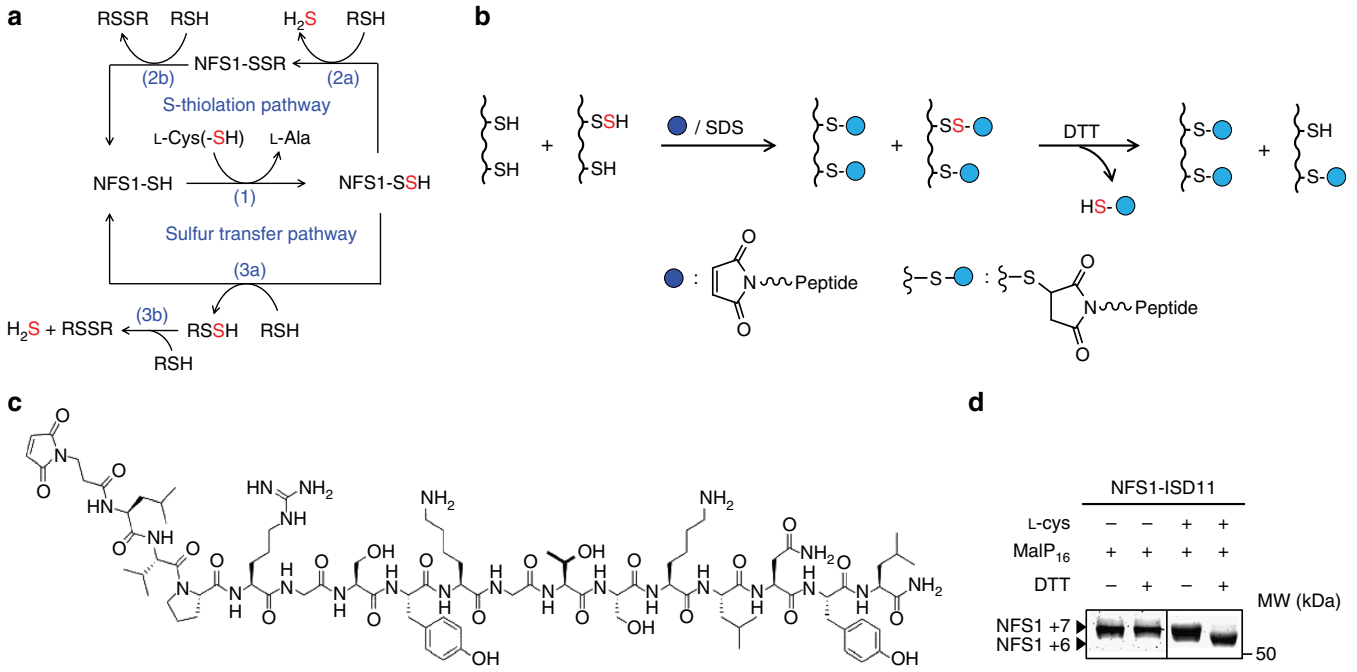


Figure 1 | Maleimide-peptide assay principle. (**a**) Catalytic cycle of the cysteine desulfurase NFS1. (1) formation of persulfide on NFS1 (NFS1-SSH) through PLP-catalyzed desulfurization of L-cysteine that generates L-alanine as a by-product. NFS1 persulfide can be reduced by thiols (RSH) by two different mechanisms: *S*-thiolation (2) or sulfur transfer (3). The *S*-thiolation pathway leads first to sulfide release and *S*-thiolation of NFS1 (NFS1-SSR) (2a) and then reduction of NFS1-SSR by a second thiol (2b). The sulfur transfer pathway leads first to sulfur transfer on the thiol that generates a persulfurated thiol (RSSH) (3a) and then hydrogen sulfide after reduction by a second thiol (3b). (**b**) Reaction scheme of alkylation assay principle by maleimide-peptide (MalP) for identification of persulfide. The reactions of formation and reduction of persulfide are quenched by adding MalP (dark blue) under denaturing conditions (SDS) that alkylates all the thiol groups including persulfurated and non-persulfurated cysteines. The presence of a persulfurated cysteine is revealed by the loss of the succinimide-peptide moiety (light blue) on reduction of the disulfide bond of the persulfide by DTT. The different species are then separated by SDS-PAGE. (**c**) Structure of the $MalP_{16}$ maleimide-peptide. (**d**) Maleimide-peptide assay of NFS1 persulfide before and after reaction with L-cysteine. The alkylated forms of NFS1 are indicated as NFS1 + 7 and NFS1 + 6 corresponding to seven and six cysteine residues alkylated by $MalP_{16}$, respectively.

amount of FXN and ISCU that would generate the maximal effect on NFS1 cysteine desulfurase activity (Supplementary Fig. 2f–h). Maximal attenuation was obtained with 1 molar equivalent of ISCU for 20 μM of the NI complex. In the absence of ISCU, FXN did not alter NFS1 cysteine desulfurase activity, in agreement with the lack of interaction between FXN and the NI complex. In the presence of one equivalent of ISCU, one equivalent of FXN gave the maximal stimulatory effect with 20 μM of the NI complex. At these concentrations, these proteins are thus predominantly in the form of the NIU and NIUF complexes. Moreover, these results are consistent with the reported stoichiometries in the NIU and NIUF complexes[11]. We concluded that the low amount of the NIUF complex detected by size exclusion chromatography at 100 μM was probably due to dissociation of FXN from the NIU complex during elution on the gel filtration column. Under these conditions, NFS1 was almost entirely converted to its persulfurated form (~95%) 10 s after reaction with L-cysteine, and this irrespective of the presence of FXN and/or ISCU (Fig. 2a). Mammalian FXN is thus not required for persulfide formation on NFS1, in contrast to what was shown for the yeast homologue of FXN, Yfh1, even when using the concentrations of enzyme and L-cysteine reported in this study (Supplementary Fig. 1b)[12].

We next characterized the persulfide formed on NFS1 by mass spectrometry. The mass spectrum of NFS1 displayed two peaks, one at 46,322 ± 1 Da, identified as NFS1 (expected mass of 46,322 Da) and the other one at 46,500 ± 1 Da (Fig. 2b), attributed to an *N*-gluconoylated form of NFS1 (+178 Da) either on the first histidine of the His-tag or on the NH_2 N-terminus of NFS1 (ref. 35), as shown by LC-ESI-ORBITRAP-MS/MS characterization of the peptide mass fingerprint (Supplementary Fig. 3a,b and Supplementary Table 1). Upon reaction of the NI complex with L-cysteine, two major species were detected, corresponding to NFS1 and its *N*-gluconoylated form each carrying a mass increment of 32 ± 1 Da, consistent with the incorporation of a single sulfur atom (Fig. 2c). About 30% of non-persulfurated NFS1 was also detected that probably originates from the loss of the sulfane sulfur under the conditions of mass spectrometry[36], as this species was not detected by the alkylation assay. Similar species were detected when the NI complex was reacted with L-cysteine in the presence of FXN and/or ISCU (Supplementary Fig. 3c–e). These results establish that the main species characterized by the maleimide-peptide assay are mono-persulfurated forms of NFS1. Importantly, these data confirm the results of the maleimide-peptide assay indicating that FXN is not required for persulfide formation on NFS1.

FXN enhances sulfur transfer from NFS1 persulfide to ISCU. We next investigated persulfide transfer from NFS1 to ISCU using the maleimide-peptide assay (Fig. 2d). Before reaction of the NIU complex with L-cysteine and upon reaction with $MalP_{16}$, the majority of ISCU carried four succinimide-peptide moieties (denoted ISCU + 4, see Supplementary Fig. 1c). A small amount of ISCU (<5%) was mono-persulfurated (ISCU + 3) as a result of persulfuration of the overexpressed protein within bacteria.

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

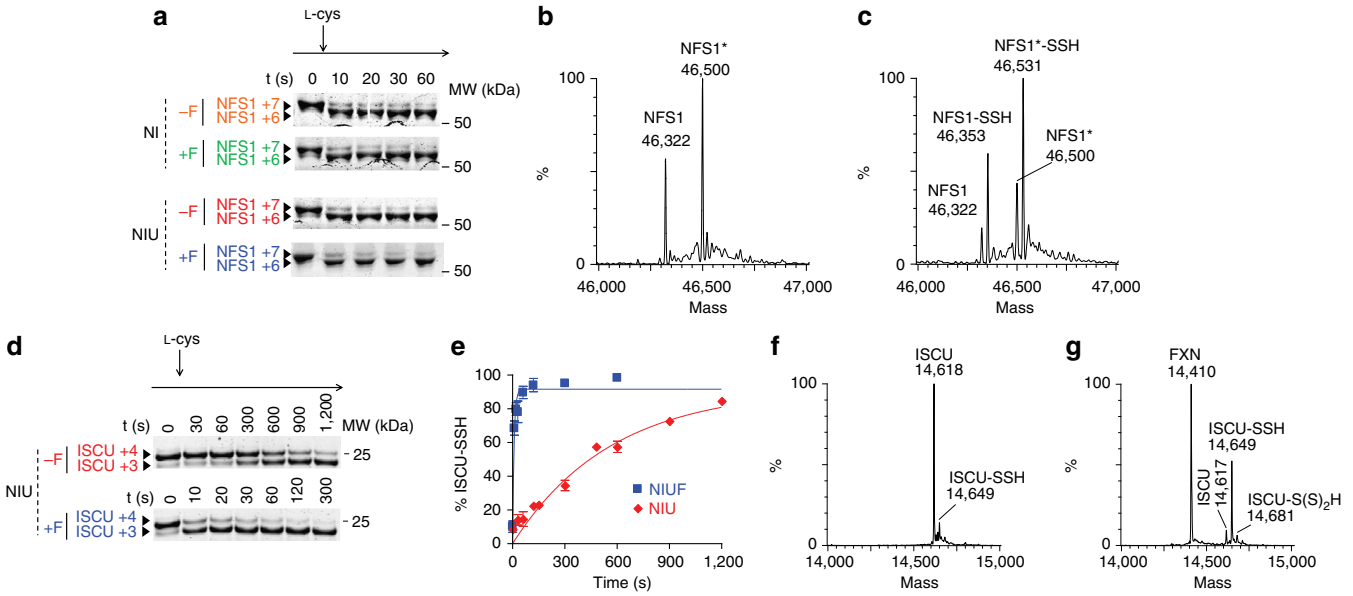


Figure 2 | Influence of FXN on NFS1 and ISCU persulfide formation. (**a**) Kinetics of persulfide formation on NFS1 in mixtures containing the NI complex alone (25 μM) or the NI complex (25 μM) and equimolar amounts of ISCU and/or FXN, monitored by alkylation assay. The reaction was initiated by adding L-cysteine and analysed under reducing conditions by SDS-PAGE. The +7 and +6 species represent NFS1 with seven and six cysteines alkylated by $MalP_{16}$, respectively. (**b**,**c**) ESI-Q/TOF spectra of the NI complex before (**b**) and after (**c**) reaction with L-cysteine. The asterisk represents *N*-gluconoylated NFS1. (**d**) Kinetics of ISCU persulfide formation in the NIU and NIUF complexes (25 μM) monitored by alkylation assay. The reaction is initiated by L-cysteine (500 μM) and analysed under reducing conditions. The different alkylated forms of ISCU are indicated as ISCU + 4 and ISCU + 3 corresponding to four and three cysteines alkylated by $MalP_{16}$, respectively. (**e**) Graphical representation of ISCU persulfide (ISCU-SSH) formation kinetics in the NIU and NIUF complexes determined by quantification of the gels in **c**. The percentage of ISCU-SSH is defined by the amount of the +3 species relative to the sum (+4 + +3). The solid line represents the best fit using a first-order rate equation. (**f**,**g**) ESI-Q/TOF mass spectra of the NIU complex on reaction with L-cysteine in the absence (**f**) and presence (**g**) of FXN. The spectra represent a zoom on the 14,000–15,000 range.

Residual amounts of this persulfurated form were still present after reduction by DTT (see Methods). On reaction of the NIU complex with L-cysteine, the ISCU + 4 species was gradually converted to the ISCU + 3 species (Fig. 2d,e). Remarkably, when the reaction was performed in the presence of FXN, the conversion occurred about 50-fold faster (Table 1). These results indicate that FXN enhances the rate of persulfide formation on ISCU.

Mass spectrometry analysis showed that after 3 min of reaction of the NIU complex with L-cysteine, ISCU was detected as a main peak at 14,618 ± 1 Da that closely matched the theoretical mass of reduced ISCU (expected mass 14,618 Da) and as a minor peak at 14,649 ± 1 Da that corresponds to a mono-persulfurated form of ISCU (expected mass of 14,650 Da) (Fig. 2f and Supplementary Fig. 3f). When the reaction was performed in the presence of FXN, ISCU was almost entirely converted into the mono-persulfurated form with a minor fraction present as a bis-persulfurated form (expected mass of 14,682 Da; Fig. 2g and Supplementary Fig. 3g). These data confirm that, as observed with the maleimide-peptide assay, FXN enhances sulfur transfer to ISCU, and also establish that the species persulfurated on a single cysteine are mainly mono-persulfurated forms of ISCU.

To establish which of the four cysteine residues of ISCU is(are) modified, tryptic digests of the NIU and NIUF complexes were analysed by LC-ESI-ORBITRAP-MS/MS followed by MS/MS (Table 2, Supplementary Fig. 4a–d and Supplementary Table 2). All four ISCU cysteine-containing peptides were detected, and only those containing C35 and C104 were detected with a persulfide, both in the NIU and NIUF complexes. Semi-quantitative analysis indicated that C104 was persulfurated by 65% in the NIU complex and by 60% in the NIUF complex, whereas C35 was persulfurated by 2–5% in either complex (Table 2). To assess which ISCU cysteine is the primary persulfide receptor, we prepared cysteine-to-serine substitution mutants of the three conserved ISCU cysteines C35, C61 and C104 (C35S, C61S and C104S mutants) and used them in the reaction system. The C61S mutant was only expressed as a truncated polypeptide that did not inteact with the NI complex and was therefore discarded (Supplementary Fig. 5). The C35S and C104S ISCU mutants were expressed as full-length polypeptides that could form a ternary complex with the NI complex. Using the maleimide-peptide assay, we observed that the persulfuration of ISCU was abolished with both the C104S and C35S mutants, and was not influenced by FXN (Fig. 3). These data indicate that C35

Table 1 | Effects of FXN and ISCU on the single turnover kinetic parameters.

Proteins and complexes	Reductant	k_R^{NFS1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_T (s^{-1})	k_R^{ISCU} ($M^{-1}s^{-1}$)
NI	DTT	2.9 ± 0.5	NA	NA
NI + F	DTT	2.9 ± 0.5	NA	NA
NIU	DTT	0.6 ± 0.2	0.0017 ± 0.0002	0.23 ± 0.1
NIUF	DTT	14 ± 4	>0.09*	0.30 ± 0.1
NIUF	GSH	0.1 ± 0.05	>0.09*	≈ 0

DTT, dithiothreitol; FXN, frataxin; GSH, glutathione; NA, not applicable.
k_R^{NFS1}, k_T and k_R^{ISCU} represent the rate constants of NFS1 persulfide reduction, NFS1 persulfide transfer to ISCU and ISCU persulfide reduction, respectively, determined using maleimide-peptide assays. Each data set was fitted using second-order and first-order rate equations for reduction and transfer, respectively (see Methods). The values represent the mean of three independent experiments with associated s.e.
*Indicate the minimum value that can be determined in that case using the maleimide-peptide assay.

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Table 2 | Identification of ISCU persulfurated peptides in the NIU and NIUF complex.

Peptide	Cysteine	Expected masses			NIU			NIUF		
		CAM	S-CAM	$(O)_2$-CAM	CAM	CAM + 32	%	CAM	CAM + 32	%
NVGTGLVGAPACGDVMK	C35	1,645.8036	1,677.7757	1,677.7934	1,645.8035	1,677.7759 (31.9724)	5	1,645.8044	1,677.7758 (31.9714)	2
TFGCGSAIASSSCATEWVK	C61	1,971.948	2,003.9201	2,003.9378	1,971.9519	ND	NA	1,971.9529	ND	NA
ELCCPPVK	C96	955.5281	987.5002	987.5179	955.5287	ND	NA	955.5289	ND	NA
LHCSMLAEDAIK	C104	1,387.6708	1,419.6429	1,419.6606	1,387.6714	1,419.6429 (31.9715)	65	1,387.6697	1,419.6427 (31.9730)	60

CAM, carbamidomethyl; NA, not applicable; ND, not detected; $(O)_2$-CAM, CAM with two oxygen; S-CAM, CAM with persulfide.
LC-ESI-MS/MS-ORBITRAP analysis of the tryptic digests of the NIU and NIU complexes after reaction with L-cysteine. The table displays the expected masses of ISCU cysteine-containing petides carrying the following modifications on the cysteine residue: CAM, S-CAM and $(O)_2$-CAM. The experimental masses were determined with a 5-p.p.m. tolerance and those matching the CAM and CAM + 32 Da modifications are listed with the corresponding quantifications (%; see Methods). The mass differences between the CAM + 32 and CAM peptides are displayed under coma and are consistent with a sulfur atom (exact mass 31.9721) but not with two oxygen atoms (exact mass 31.9898).

and C104 are both important for *trans*-persulfuration and/or that each of these mutations alter the *trans*-persulfuration process potentially by modifying the structure of the putative Fe-S cluster-binding site. Although these data cannot tell which of C35 or C104 is the primary ISCU receptor of NFS1 persulfide, they clearly establish that C104 is the major sink of persulfide on ISCU.

We then enquired how the persulfide is transferred from NFS1 to ISCU, whether directly from the PLP cofactor of NFS1, from NFS1 persulfide or via small thiol-containing carriers, specifically L-cysteine. Persulfurated NFS1 (NFS1-SSH) was first generated, excess L-cysteine was then removed and ISCU alone or together with FXN were added. We observed that concomitant to the disappearance of NFS1 persulfide, ISCU became persulfurated. Moreover, the rate of ISCU persulfuration measured in the absence of L-cysteine was similar to the one measured in its presence (Supplementary Fig. 6a,b). These data indicate that the transfer of sulfur proceeds by a direct attack of one of ISCU cysteine on NFS1 persulfide in both the NIU and NIUF complexes.

So far we have shown that FXN is not required for persulfide formation on NFS1 but stimulates sulfur transfer from NFS1 persulfide to ISCU which could explain the stimulatory effect of FXN on the global rate of sulfide production, if ISCU persulfide is reduced faster than NFS1 persulfide and is thus the main source of sulfide. To assess this hypothesis, we sought to determine the individual rates of persulfide reduction for NFS1 and ISCU and to investigate the influence of FXN on the rates of these reactions.

FXN enhances sulfur transfer from NFS1 persulfide to DTT. We first investigated the reaction of NFS1 persulfide reduction with DTT. The persulfides were generated on NFS1 and ISCU by incubating mixtures of equimolar amounts of NFS1–ISD11, ISCU and FXN with L-cysteine. Then, L-cysteine was removed, as it would regenerate the persulfide on NFS1 following its reduction, and DTT was added. We first noticed that NFS1 persulfide reduction was much slower than its formation (Fig. 4a, and see Fig. 2a), which indicated that reduction of NFS1 persulfide is the rate-limiting step of the cysteine desulfurase cycle under these conditions (reaction 2 or 3, Fig. 1a). Remarkably, ISCU and FXN both altered the rate of NFS1 persulfide reduction, but in opposite ways (Fig. 4a,b). While the binding of ISCU to the NI complex slowed down the reaction, the binding of FXN to the NIU complex enhanced it, but had no effect on the NI complex. The data were fitted assuming that reduction of NFS1 persulfide by DTT is a bimolecular reaction (see below, see also Methods; Table 1). The values of the rate constants indicated that ISCU slows down the reaction by fivefold and FXN stimulates the reduction of NFS1 persulfide by approximately 25-fold as compared with NIU.

Two different mechanisms of reduction by thiols are feasible, through *S*-thiolation of NFS1 or sulfur transfer to the thiol

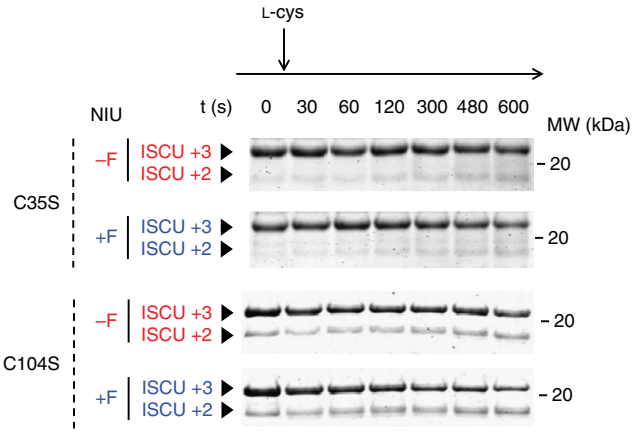


Figure 3 | Identification of the persulfurated cysteines of ISCU. Alkylation assays with C35S and C104S ISCU mutants. The kinetics of ISCU persulfide formation in the NIU and NIUF complexes (25 μM) prepared with the C35S and C104S ISCU mutants were initiated with L-cysteine (500 μM) and analysed under reducing conditions. The +3 and +2 species represent non-persulfurated and persulfurated ISCU mutants, respectively.

(Fig. 1a). In the case of the *S*-thiolation pathway, a DTT adduct is expected that will appear as an NFS1 + 6 species under non-reducing conditions in the alkylation assays. Under these conditions, no NFS1 + 6 species was detected (Supplementary Fig. 6c), indicating that NFS1 persulfide is reduced through sulfur transfer on DTT. We thus conclude that FXN stimulates and ISCU slows down sulfur transfer to DTT and that the effect of FXN relies on the presence of ISCU.

FXN does not enhance ISCU persulfide reduction. We next examined the influence of FXN on the rate of ISCU persulfide reduction by DTT starting from fully persulfurated forms of both NFS1 and ISCU. The rates of ISCU persulfide reduction were similar in the absence or presence of FXN (Fig. 4c,d), indicating that FXN does not affect this step. The comparison of the respective rate constants of ISCU and NFS1 persulfide reduction by DTT indicated that reduction of NFS1 persulfide is faster than reduction of ISCU persulfide, by threefold in the absence of FXN and 45-fold in its presence (Table 1), suggesting that ISCU may not contribute to the global sulfide production when DTT is used as a reductant.

Taken together, the results of the single-turnover kinetics indicate that FXN enhances the rate of two reactions: sulfur transfer to ISCU and sulfur transfer to DTT. However, since DTT is not a physiological reductant, we wondered whether the effect of FXN and the differences in the rates of persulfide reduction between NFS1 and ISCU could be observed with physiologically relevant reductants.

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

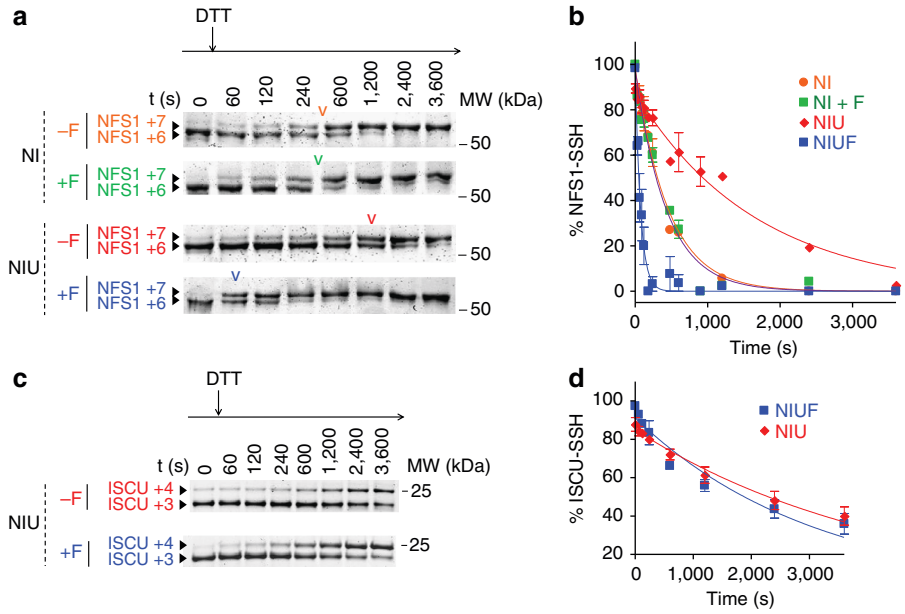


Figure 4 | Influence of FXN on the reduction of NFS1 and ISCU persulfides. (**a**) Kinetics of NFS1 persulfide reduction in mixtures containing the NI complex alone (25 μM) or the NI complex (25 μM) and equimolar amounts of ISCU and/or FXN, monitored by alkylation assay. The reaction was initiated by DTT (1 mM) and analysed under reducing conditions. The reduction of NFS1 persulfide was characterized by appearance of the NFS1 + 7 species. The 'v' symbol indicates the time to reach 50% reduced NFS1. (**b**) Graphical representation of NFS1 persulfide reduction kinetics determined from quantification of the gels in **a**. The percentage of NFS1-SSH is defined by the amount of the +6 species relative to the sum (+7 + +6). The solid line represents the best fit using a second-order rate equation. (**c**) Kinetics of ISCU persulfide reduction in the NIU and NIUF complexes (25 μM) monitored by alkylation assay. The reaction is initiated with DTT (1 mM) and analysed under reducing conditions. The reduction of ISCU-SSH is characterized by the appearance of the +4 species corresponding to non-persulfurated ISCU. (**d**) Graphical representation of ISCU persulfide (ISCU-SSH) reduction kinetics in the NIU and NIUF complexes, determined by quantification of the gels in **c**. The solid line represents the best fit using a second-order rate equation.

L-cysteine and GSH reduce NFS1 persulfide. Using the maleimide-peptide assay, we assayed persulfide reductase activities of two electron donors postulated to enable persulfide reduction[37–39], ferrous iron (Fe^{2+}) and mammalian mitochondrial ferredoxin 2, FDX2, in its reduced state. Neither iron alone or together with FDX2 had an impact on NFS1 or ISCU persulfides (Supplementary Fig. 7a).

We thus tested the thiol-containing molecules, GSH, which contributes to cytosolic Fe-S cluster assembly in yeast by a still undefined mechanism[40,41] and L-cysteine. GSH did not affect ISCU persulfide even after 60 min, but could reduce NFS1 persulfide (Supplementary Fig. 7b) albeit at a rate approximately 140-times lower than DTT (Table 1). To test L-cysteine, the maleimide-peptide assay could not be used since L-cysteine would regenerate NFS1 persulfide following its reduction. We instead monitored L-alanine production (Fig. 5a). For each concentration of L-cysteine, the amount of L-alanine generated exceeded the concentration of the NI complex, which indicated that several turnovers were achieved and thus that L-cysteine was able to reduce NFS1 persulfide. Cystine (oxidized cysteine), which is the expected by-product of persulfide reduction by L-cysteine, was concomitantly generated in the reaction mixture, further supporting this conclusion (Supplementary Fig. 7c–e). To determine whether L-cysteine reduces NFS1 through sulfur transfer or *S*-thiolation (Fig. 1a), we analysed the kinetics of persulfide formation under non-reducing conditions since an NFS1 + 6 species is expected to appear in the case of the *S*-thiolation pathway. No L-cysteine adduct was detected under these conditions, which is consistent with the sulfur transfer mechanism of reduction (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1b). Moreover, the kinetics of Fe-S cluster reconstitution performed with L-cysteine as a reductant (without DTT), displayed a lag phase indicative of a delay in sulfide release (Supplementary Fig. 8a–c). Such a lag phase is not expected in the case of the *S*-thiolation mechanism for which sulfide release should initiate immediately upon adding L-cysteine, whereas it is consistent with the sulfur transfer mechanism for which sulfide release is not directly correlated with NFS1 persulfide reduction but with the subsequent step of reduction of the persulfurated thiol (Fig. 1a, reaction (3b)). These data thus further support the sulfur transfer mechanism.

Altogether, the single-turnover kinetics indicate that thiols such as DTT, L-cysteine and GSH are able to reduce NFS1 and ISCU persulfides but these reactions are not synchronized. The reduction of NFS1 persulfide by thiols is apparently more efficient than the reduction of ISCU persulfide. We have thus asked whether the reduction of ISCU contributes to sulfide release in multiple-turnover kinetics.

Thiol-dependent sulfide release is mediated by NFS1 persulfide. We investigated the influence of FXN on the rate of L-alanine production. Analysis of multiple-turnover kinetics under steady-state conditions is also a powerful tool to determine the mechanism by which L-cysteine reduces protein persulfide. Two mechanisms were considered: (i) formation of an enzyme–substrate complex as described by the Michaelis–Menten model for which the initial velocity reaches a plateau when the concentration of substrate increases as the enzyme becomes saturated[42] and (ii) a bimolecular process for which non-saturation behaviour is expected. We thus measured initial velocities of L-alanine production under steady-state conditions (see Methods) for various concentrations of L-cysteine. The variations of the initial velocities of L-alanine formation by the NI complex alone or in the presence of

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

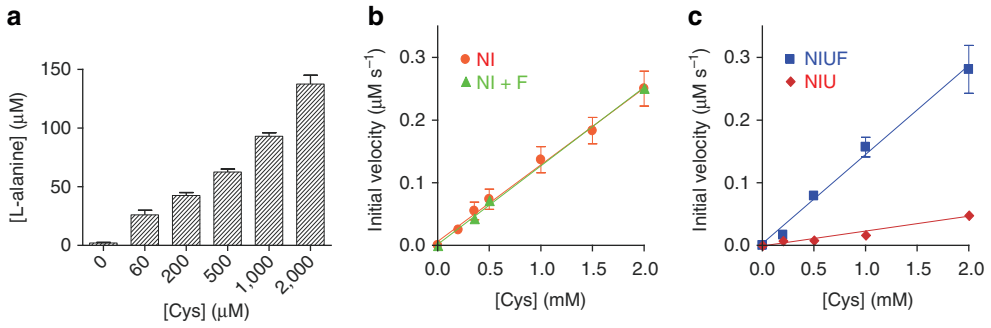


Figure 5 | Effects of FXN on the NFS1–ISD11–ISCU complex in multiple-turnover kinetics. (**a**) Effects of L-cysteine concentration on the amount of L-alanine produced by the NIUF complex. The reactions were performed with the NIUF complex (20 μM) and increasing amounts of L-cysteine in the absence of DTT. L-alanine production was monitored by ADH assays after 10 min of reaction. (**b**,**c**) Effect of FXN and ISCU on the initial velocities of L-alanine formation under steady-state conditions. The NI complex (20 μM) alone and with equimolar amounts of FXN (**b**) and the NIU and NIUF complexes (20 μM) (**c**) were incubated with various amounts of L-cysteine and the initial velocities were plotted as a function of L-cysteine concentrations. The bars represent the s.e. from three independent experiments. The lines represent the linear regression.

equimolar amounts of FXN and/or ISCU displayed a linear relationship with the concentration of L-cysteine up to 2 mM (Fig. 5b,c). Such behaviour is a feature of bimolecular reactions. A similar mechanism was reported for the IscS-like cysteine desulfurase Slr0387 from *Synechocystis sp.* PCC 6803 that exhibited second-order kinetic with thiols as reducers of the persulfide[43]. However, saturation behaviours that were interpreted using the Michaelis–Menten model, were obtained by other groups with mammalian NFS1 using higher L-cysteine to NFS1 ratios (1,000 equivalents of L-cysteine for the highest concentration versus 100 equivalents of L-cysteine here)[11,14,32]. By increasing L-cysteine concentration above 2 mM, we indeed observed that the variation of the initial velocity deviated from linearity and even decreased at very high L-cysteine concentrations for the NIU complex (Supplementary Fig. 9a). Analysis using the Michaelis–Menten equation yielded K_M values in the range of 50–150 mM. These K_M values are unlikely physiological. Moreover, they are much higher than those reported earlier, that is, in the 10–40 μM range[11,14,32], indicating that the K_M values are concentration dependent, which is not consistent with an enzyme–substrate model. L-cysteine and DTT were reported to inhibit the cysteine desulfurase Slr0387 from *Synechocystis sp.* PCC 6803 and NifS from *E. coli*[43,44]. Therefore, we hypothesized that the saturation behaviours observed by other groups with NFS1 could be due to inhibition caused by L-cysteine itself at ratios above 100 equivalents.

The bimolecular rate constants determined by linear regression of the data indicated that FXN did not alter the rate of L-alanine production by the NI complex but significantly enhanced it in the presence of ISCU (Fig. 5b,c and Table 3). Conversely, the binding of ISCU to the NI complex decreased the rate of L-alanine production by the NI complex. These effects are reminiscent of the effects of FXN and ISCU on NFS1 persulfide reduction by DTT observed by single-turnover kinetics (see Fig. 4a,b). However, in these multiple-turnover kinetics, the reduction of ISCU persulfide may also contribute to the global rate of L-alanine production, we thus sought to determine the rate-limiting step of the catalytic cycle.

To selectively disturb persulfide reduction without affecting its formation, we examined the influence of DTT on the global rate of L-alanine production, since DTT is only involved in the reduction step. We observed that the initial velocity of L-alanine production increased with the concentration of DTT, which is a first indication that reduction is rate-limiting (Supplementary Fig. 9b). This conclusion was supported by a second observation. The plot of L-alanine formation by the NI complex alone or in the presence of FXN and/or ISCU, when extrapolated to $t = 0$ did not intersect the y axis at $y = 0$ and the amount of L-alanine generated was correlated to the amount of complex (Supplementary Fig. 9c–g). This initial burst represents the amount of L-alanine generated during the first half-turnover of NFS1 persulfide formation (reaction 1, Fig. 1a) and the following part of the reaction ($t > 0$) reflects subsequent turnovers for which reduction is now required. The respective rates of these two different phases: $> 20\ \mu M\ s^{-1}$ for persulfide formation and in the range of 0.1 to $1\ \mu M\ s^{-1}$ for the second part indicate that reduction is slowing down the reaction and thus that it is the rate-limiting step. A similar initial burst was observed in the absence of DTT with L-cysteine as the reductant, indicating that reduction is still rate limiting under this condition (Supplementary Fig. 9h).

The single-turnover kinetics indicated that the reduction of ISCU persulfide by thiols is slower than the reduction of NFS1 persulfide and we confirmed that ISCU persulfide does not contribute to the global rate of L-alanine production by measuring the rates of L-alanine production by the NIU complexes assembled from the C104S and C104G ISCU mutants that are non-persulfurable (Supplementary Fig. 9i). Moreover, the bimolecular rate constants for reduction by DTT determined from the multiple turnover experiments were in very good agreement with those determined in single turnover for reduction of NFS1 persulfide by DTT (compare Tables 1 and 3 for DTT). We thus identify persulfide reduction as the rate-limiting step of the catalytic cycle, while ISCU persulfide reduction does not

Table 3 | Effects of FXN and ISCU on the multiple turnover kinetic parameters.

Proteins and complexes	Reductant	$k_{R,MT}^{NFS1}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
NI	L-cys	6.1 ± 0.5
NI + F	L-cys	6.2 ± 0.5
NIU	L-cys	1.2 ± 0.2
NIUF	L-cys	7.1 ± 0.5
NI	DTT	5.3 ± 0.5
NI + F	DTT	5.0 ± 0.5
NIU	DTT	0.6 ± 0.2
NIUF	DTT	12 ± 1

DTT, dithiothreitol; FXN, frataxin; L-cys, L-cysteine.
The bimolecular rate constants of NFS1 persulfide reduction, $k_{R,MT}^{NFS1}$, were determined from multiple-turnover kinetics by linear regression of the initial velocities of L-alanine formation plotted as a function of initial reductant concentrations.

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

contribute. These results establish that FXN stimulates and ISCU slows down the reduction of NFS1 persulfide by thiols.

Discussion

The functional role of the small mitochondrial protein FXN has been the focus of much interest since its discovery[8]. Only recently it was demonstrated that FXN associates with the early components of the mitochondrial Fe-S cluster biogenesis pathway, NFS1 and ISCU[2,23]. It was then reported that in the presence of ISCU, mammalian FXN stimulates sulfide production by NFS1 and this was correlated with stimulation of Fe-S cluster assembly[11,14]. Here we confirm that FXN interacts with the ternary NFS1–ISD11–ISCU (NIU) complex to form a quaternary NFS1–ISD11–ISCU–FXN (NIUF) complex. Our titration assays indicate that FXN is mainly associated with the NIU complex at 20 μM and similar results were obtained by other groups with protein concentrations down to 1 μM[11,14], which means that the dissociation constant of the NIUF complex is much lower than 1 μM. However, the size exclusion chromatography profiles show that FXN dissociates from the NIU complex during elution at 100 μM, whereas ISCU remained associated with NFS1 in the same conditions. These observations suggest that the inteaction of FXN with the NIU complex may be more dynamic than the interaction of ISCU with NFS1 (rapid versus slow dissociation) as also proposed in another study[45] and possibly to facilitate exchange with other accessory proteins on the NIU complex.

We have then studied the mechanism by which FXN may stimulate Fe-S cluster assembly. Here we show that FXN modulates the rate of sulfur transfer to ISCU and reduction of NFS1 persulfide by free thiols. To reach this conclusion, we have developed a novel method to probe and quantify protein persulfides. This assay is based on detection of protein gel mobility shifts upon reduction of persulfurated cysteine labelled with synthetic maleimide-peptide and was validated by direct identification of persulfide through mass spectrometry analysis. Compared with the other techniques described for identification of persulfide[46–48], the peptide-maleimide assay provides additional advantages, including the small number of steps required before analysis, its selectivity and owing to its ratiometric nature it provides an accurate quantification of the ratio of persulfurated versus non-persulfurated species. Moreover, it is the first assay enabling determination of the number of persulfurated cysteine residues.

This assay was a powerful tool to disentangle formation, reduction and transfer of NFS1 persulfide and thereby to study single-turnover kinetics of these reactions. We have characterized the different events triggered by the reaction of NFS1 with L-cysteine and we have estimated the rates of the these reactions. The reaction is initiated by the formation of a persulfide on NFS1, which is the fastest reaction of the catalytic cycle. The sulfane sulfur of NFS1 persulfide is then rapidly transferred to ISCU in a *trans*-persulfuration process leading to persulfuration of ISCU on one of its cysteine residues. Upon regeneration of NFS1 persulfide by L-cysteine, this persulfide is reduced by external thiols such as DTT, GSH and L-cysteine. The reduction of NFS1 persulfide likely proceeds by sulfur transfer rather than *S*-thiolation (Fig. 1a). ISCU persulfide is also reduced by external thiols but at a markedly slower rate than NFS1 persulfide. The analysis by mass spectrometry indicates that the persulfides generated on NFS1 and ISCU are mainly mono-persulfides. Although we cannot firmly establish which of the three conserved cysteine of ISCU (C35, C61 or C104) is the primary receptor of NFS1 persulfide, we have identified C104 as the main persulfurated cysteine of ISCU. We have also demonstrated that this reaction is direct and proceeds by a direct nucleophilic attack of one ISCU cysteine on the persulfide of NFS1.

We have then investigated the influence of FXN on these reactions. The single-turnover kinetics first provide evidence that formation of NFS1 persulfide reaches ≈95% completion in 10 s, irrespective of the presence of ISCU and/or FXN. We thus conclude that FXN is not required for persulfide formation of NFS1 as confirmed by mass spectrometry analysis. These results challenge two recent studies reporting a stimulatory effect of FXN and its yeast homologue, Yfh1, on NFS1 persulfide formation[12,31]. In these studies, the formation of persulfide was monitored using ^{35}S labelling of L-cysteine. Unfortunately, as the persulfide were not protected by alkylation before running electrophoresis under denaturating conditions, it is not excluded that they were reduced or exchanged with other cysteines, which may explain the discrepancy between our respective studies. However, since the formation of NFS1 persulfide was almost complete in 10 s for all the complexes, we cannot exclude the possibility that FXN stimulates persulfide formation on a timescale below 10 s.

The single-turnover kinetics reveal that FXN enhances the rate of sulfur transfer from NFS1 persulfide to ISCU and sulfur transfer of NFS1 persulfide to the small thiol-containing molecule DTT, L-cysteine and GSH. Conversely, ISCU slows down sulfur transfer to these thiols. In contrast, FXN does not alter the rate of ISCU persulfide reduction. The multiple-turnover kinetics indicate that the reduction of NFS1 persulfide is the rate-limting step of the catalytic cycle, hence that the effects of FXN and ISCU on the global rate of the reaction are only related to a modulation of the rate of NFS1 persulfide transfer to these thiols, regardless of a possible additional effect of FXN on NFS1 persulfide formation. These data confirm the results of the single-turnover kinetics. The reduction step is also the rate-limiting reaction of the catalytic cycle of other group I cysteine desulfurases, which suggests that this might be a common feature of this class of enzymes[43,44,49]. Taken together, our results thus point to a unique molecular function of FXN as an enhancer of sulfur transfer to ISCU and small free thiols (Fig. 6). Sulfide release does occur subsequently, upon condensation of the persulfurated thiol with a second thiol (Fig. 1a, reaction (3b)), but is not directly catalysed by FXN.

These results rule out the hypothesis that FXN stimulates sulfide release by enhancing persulfide formation on NFS1, as proposed by others[11,12,14,31]. FXN has also been proposed to stimulate iron entry within the NIU complex in Fe-S cluster reconstitution assays with DTT[11]. However, since the stimulation of sulfide release, in turn increases the amount of iron bound in the form of Fe-S clusters, the higher proportion of iron bound to the NIUF complex versus the NIU complex, might be a consequence of the enhancement of sulfide production by FXN.

These data raise several questions on the physiological mechanism of Fe-S cluster biogenesis: what is the respective role of the two reactions of transfer? Are these reactions correlated with physiologically relevant Fe-S cluster assembly on ISCU? We first determined that ISCU persulfide does not contribute to sulfide release and is not even reduced in Fe-S cluster reconstitution assays when thiols are used as reductants (Supplementary Fig. 10a–d). Thus, under these conditions, sulfide production arises exclusively from reduction of NFS1 persulfide and FXN drives Fe-S cluster assembly by enhancing this reaction. However, the rate of Fe-S cluster assembly is slow when DTT and/or L-cysteine are used as reductants (1 h to complete reconstitution on ISCU with L-cysteine) and the reconstitution is inefficient as at least 30 equivalents of sulfide ions are produced in 1 h with L-cysteine (according to the rate constants, Table 3) while only two equivalents would be required for building up a [2Fe2S] cluster (Supplementary Figs 8 and 10). These observations suggest that L-cysteine (and also GSH which is an even less efficient reducer of NFS1 persulfide) are not the physiological

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

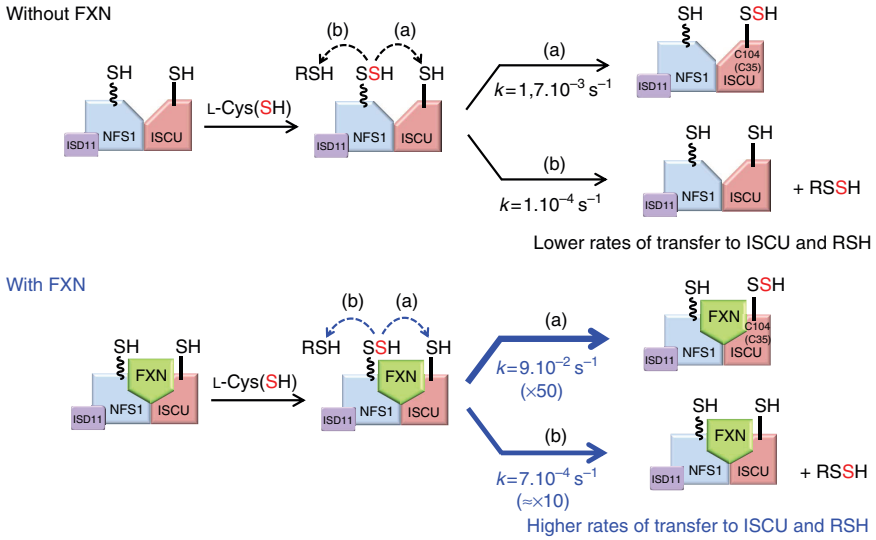


Figure 6 | Molecular model for the function of FXN in the ISC machinery. In the presence of FXN, the rates of two reactions are enhanced (a) sulfur transfer to ISCU and (b) sulfur transfer to free thiol-containing molecules (RSH) such as L-cysteine and GSH. The rate constants are indicated. For comparison of the rates of transfer to ISCU and RSH, a first-order rate constant for sulfur transfer to RSH has been computed assuming a concentration of 100 μM of L-cysteine that is close to the physiological concentration[50].

reductants or that other accessory proteins might be required to secure Fe-S cluster assembly. More likely, since FXN specifically activates sulfur transfer to ISCU, the persulfuration of ISCU might have a functional role in Fe-S cluster assembly but a dedicated reductase is lacking in the Fe-S cluster reconstitution assays. The human ferredoxin FDX2, which provides electrons for Fe-S cluster biogenesis[38,39], is a potential candidate for the reduction of ISCU. However, under our conditions, we were not able to measure any persulfide reductase activity with FDX2. Nervertheless, we cannot exclude that under physiological conditions, FDX2 could be involved in the reduction of ISCU and NFS1 persulfides by a mechanism that still needs to be defined. Following this hypothesis, the stimulation of sulfur transfer to small thiol molecules by FXN may serve another function, possibly sulfur trafficking within the cell.

Collectively, our data point to a specific role of FXN in the control of NFS1 persulfide reduction by thiols, enhancing sulfur transfer to both ISCU and free thiols such as L-cysteine and GSH. These data shed new light on the molecular function of FXN and on the early steps of Fe-S cluster assembly by raising important physiological questions on the mechanism of Fe-S cluster biogenesis.

Methods

Chemicals and biochemical products. Luria Bertani medium, protease inhibitor cocktail, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide, DTT, dithionite, trichloroacetic acid (TCA), L-cysteine, L-alanine, L-cystine, L-alanine dehydrogenase (ADH), β-nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD^+), ferrous ammonium sulfate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$), His_6-thrombin, iodoacetamide (IAA) were from Sigma-Aldrich; isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside was from AppliChem; disuccinimidyl tartrate from Pierce; trypsin (sequence grade) from Promega; Fmoc-amino acids and the Rink amide *p*-methylbenzlhydrylamine support were from Novabiochem; 3-maleimidopropanoic acid was from Bachem; 1-hydroxybenzotriazole ($HOBt \cdot H_2O$) from Acros Organics and ACCQ-fluo reagent kit from Waters. HiTrap chelating HP column (5 ml), HiPrep Desalting 26/10, HiLoad 26/600 prep grade Superdex 200 and Superdex 75 columns were from GE Healthcare; Amicon Ultra centrifugal filter ultracel 10 and 30 kDa from MILLIPORE, MicroBio-Spin6 columns from Bio-Rad; Rosetta2-(DE3) and pET28b from Novagen.

Plasmid and cell culture purification. The vectors expressing NFS1-(amino acid (aa) 59 to 459), ISD11, ISCU-(aa 36–168) and FXN-(aa 79–207) were kindly provided by Dr Hélène Puccio (IGBMC, Strasbourg) and their construction was reported earlier[11]. His-tags followed by thrombin (Thr) cleavage sites were introduced by mutagenesis leading to the expression plasmids pCDFDuet-(site1):His_6-Thr-NFS1-(site2):ISD11, pETDuet-(site1):His_6-Thr-ISCU and pET16-His_6-Thr-FXN. The C35S, C61S, C104S and C104G mutations were introduced in ISCU by site-directed mutagenesis (IMAGIF platform, Gif Sur Yvette, France). The vectors expressing human His_6-Thr-FDX2 (aa 53–183) from pET28b were generated by GenScript (Piscataway, USA). The Rosetta2-(DE3) cells were transformed with the plasmids and the cells were grown from a single colony at 180 r.p.m. at 37 °C in Luria Bertani medium with appropriate antibiotics. Protein expression was induced when the cells reached $OD_{600} = 0.6$ using 500 μM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside and the cells incubated for an additional 16 h at 18 °C at 180 rpm. The cell cultures were harvested by centrifugation at 5,500 r.p.m. for 10 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in buffer A (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8) containing a protease inhibitor cocktail. The cell suspensions were lysed by three cycles of French Press. Cell debris were removed by centrifugation at 45,000 r.p.m. for 45 min at 4 °C. The His-tagged proteins NFS1–ISD11, ISCU (WT and mutants), FXN and FDX2 were purified on a HiTrap chelating HP loaded with nickel ions. The resin was washed with buffer A and bound proteins were eluted by a linear gradient between buffer A and buffer B (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8). Protein fractions were mixed and concentrated on Amicon 10 or 30 kDa to 4 ml. The partially purified His_6-NFS1–ISD11 complex was incubated for 10 min with 10 mM DTT at room temperature to remove persulfide and then loaded on a HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade column pre-equilibrated with buffer C (50 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 8). The His-tag could not be removed from the NFS1–ISD11 complex as cleavage by thrombin yields non-specific cleavages. The ISCU (WT and mutants), FXN and FDX2 proteins were buffer exchanged on HiPrep Desalting 26/10 and the His-tags were successfully removed by treatment with thrombin (3.5 NIH unit of His_6-thrombin per mg of proteins) for 16 h at 22 °C. Before thrombin cleavage, ISCU and FXN both migrate as a double band on SDS–PAGE, indicating that significant amounts of these proteins were partially modified. We have attributed this modification to an *N*-gluconoylation of the His-tag as described for NFS1 (Fig. 2b,c, Supplementary Fig. 3a,b and Supplementary Table 1), since FXN and ISCU are no longer modified after cleavage of the His-tag according to mass spectrometry (Fig. 2f,g). The His-tag fragments and His_6-thrombin were removed by purification on a HiTrap chelating HP loaded with nickel ions and equilibrated with buffer A. The ISCU proteins (WT and mutants) were incubated with 10 mM DTT for 10 min to remove persulfide. The ISCU (WT and mutants) and FDX2 proteins were loaded on a HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade column pre-equilibrated with buffer C. All the proteins were aliquoted and stored in glycerol (10% final) at −80 °C. Protein concentrations were determined from absorbance at 280 nm. The purified C61S ISCU mutant migrated on SDS–PAGE with an apparent molecular weight of 10 kDa suggesting that the protein is truncated.

Formation of complexes by size exclusion chromatography. The formation of complexes was analysed by size exclusion chromatography using a Superdex S200 10/300 column (GE Healthcare). The proteins were mixed together in buffer C and eluted at a flow rate of 0.8 ml min^{-1} and 0.5 ml fractions were collected for SDS–PAGE analysis. The column was calibrated using a calibration kit (Sigma).

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

For the detection of the NIU complexes, 250 µl of a mixture containing 20 µM of the NI complex with equimolar amounts of ISCU (WT and cysteine mutants) was injected; for detection of the NIUF complexes, 200 µl of a mixture containing 100 µM of the NI complex with three equivalents of ISCU and five equivalents of the His-tagged version of FXN was injected.

Synthesis of $MalP_{16}$. The maleimide-peptide compound $MalP_{16}$ comprises a maleimide moity linked to the 16-mer Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Tyr-Lys-Gly-Thr-Ser-Lys-Leu-Asn-Tyr-Leu-NH_2 peptide. The peptide was elongated manually in a polyethylene syringe fitted with a polypropylene disc. Washing ($3\times$) of the Rink amide resin with dichloromethane (DCM) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) was followed by treatment with 20% piperidine/DMF (2×15 min) and washing (DCM, DMF, MeOH). Coupling conditions: 3 equivalents (eq.) of Fmoc-amino acid, 1-hydroxybenzotriazole and *N,N′*-diisopropylcarbodiimide (minimum amount of DCM and a few drops of DMF, 90 min), followed by washing (DCM, DMF and MeOH). Incomplete couplings (Kaiser test) were repeated with 2 eq. of reagents. Removal of Fmoc groups: 20% piperidine/DMF (1×3 min $+1\times10$ min), followed by washing (DMF, DCM). Activation of 3-maleimidopropanoic acid was carried out with the carbodiimide.

Final deprotection conditions: 90:5:5 TFA:H_2O:triisopropylsilane (2×1 h). Collected filtrate and DCM washings were concentrated under an N_2 stream and cold diethyl ether (10 volumes) was added to the resulting oil. The mixture was centrifuged (10 min, 5 °C, 4,800 r.p.m.) and decanted. This procedure was repeated three times. High-performance liquid chromatography (HPLC) purification: Phenomenex semipreparative Jupiter Proteo column (10 µm, 90 Å, 250×10 mm), A: 0.1% TFA in water, B: 0.1% TFA in acetonitrile, 3 ml min^{-1}, 280 nm, linear gradient from 25 to 50% of B. Fractions containing the pure peptide were pooled and lyophilized. Overall yield (from ultraviolet quantification, Tyr: $_{280}=1{,}480\ M^{-1}\ cm^{-1}$): 22%. Analytical HPLC: Jupiter Proteo column (4 µm, 90 Å, 250×4.6 mm), A: 0.045% TFA in water, B: 0.036% TFA in acetonitrile, 1 ml min^{-1}, 280 nm, linear gradient from 20 to 40% of B in 30 min, $t_R=13.3$ min. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (reflector, 2,5-dihydroxybenzoic acid + 0.1% TFA, positive mode): *m/z* 1,946.4 $[M+H]^+$, 1,968.4 $[M+Na]^+$, 1,984.4 $[M+K]^+$; M calc. for $C_{89}H_{140}N_{24}O_{25}$ 1,945.0.

Maleimide-peptide alkylation assay. The $MalP_{16}$ was dissolved in purified water. All maleimide-peptide alkylation assays, unless indicated, were performed in buffer C using 25 µM NFS1–ISD11 and equimolar amounts of ISCU (WT and mutants) and/or FXN. For studies of persulfide formation, the reactions were initiated with L-cysteine (500 µM) and incubated at 25 °C. For studies of persulfide reduction, fully persulfurated NFS1 and ISCU were generated by incubating the NI complex in the presence of equimolar amounts of FXN or FXN and ISCU (NIUF complex) for 3 min and the NIU complex for 25 min at 25 °C with 500 µM L-cysteine to reach completion of the *trans*-persulfuration reaction. Excess L-cysteine was removed by desalting on micro-BioSpin6. Next the reduction reactions were initiated by adding the reductant and the complexes were incubated at 25 °C. Most experiments were performed with DTT (1 mM) as a reductant. Other reductants were also tested: GSH (1 mM), reduced FDX2 and Fe^{2+} (see Supplementary Fig. 7). Reaction kinetics (formation and reduction) were monitored by sampling 10 µl of the reaction mixture at different time points, as indicated in the figures, and the reaction was stopped using either a 1.5-fold molar excess of $MalP_{16}$ relative to free thiols (protein cysteines, L-cysteine and possibly DTT) and SDS (2%) or TCA to a final concentration of 10%. For the TCA precipitation procedure, the reaction mixture was mixed with an equal volume of ice-cold TCA (20%) and the pellets were washed three times with ice-cold acetone. The protein pellets were resuspended in 10 µl buffer C containing 8 M urea and 10 mM $MalP_{16}$. The reactions quenched by $MalP_{16}$/SDS and TCA were incubated for 20 min at 30 °C, with constant shaking at 550 r.p.m. Half-reaction volumes were incubated with 1 µl of DTT at 100 mM for 20 min at 25 °C. Each reaction aliquot (7–8 µl) was analysed (500 ng of proteins) on 8 and 14% SDS–PAGE gels in non-reducing (without DTT) and reducing conditions (with DTT). TCA precipitation yielded essentially the same results as the $MalP_{16}$/SDS quenching procedure, thus $MalP_{16}$/SDS quenching was used on a day-to-day basis.

Controls were used to determine the total number of cysteines available for alkylation by $MalP_{16}$ in NFS1, which contains seven cysteine residues, and ISCU, which contains four cysteine residues (Supplementary Fig. 1a,c). $MalP_{16}$ (2 eq.) relative to total sulfhydryl content were added to NFS1 (20 µM) or to a mixture of NFS1 (20 µM) and ISCU (20 µM) in buffer C, and the alkylation reaction was stopped after 30 s using the TCA procedure. Several other modifications engaging one or two cysteines could give rise to a false positive (non-alkylable cysteine residue), such as sulfenic, sulfinic or sulfonic acid, sulfenamide and disulfide bond, but this can be readily circumvented by analysing the proteins under non-reducing conditions where non-alkylable cysteines can be detected.

Finally, the protein bands on SDS–PAGE were quantified using an Odyssey scanner (Li-Cor). The uncropped images of the gels used for the various figures are displayed in Supplementary Figs 11 and 12. The data obtained for persulfide reduction by DTT and GSH were fitted assuming a bimolecular mechanism as demonstrated in multiple-turnover kinetics for NFS1 persulfide reduction (see Fig. 5c,d) using equation (1) for second-order kinetic[42],

$$v=E_0(\exp(-k_R S_0 t)) \quad (1)$$

where S_0 is the initial concentration of reductant (DTT or GSH) and k_R the bimolecular rate constant. The data of transfer were fitted assuming a monomolecular mechanism using equation (2) for first-order kinetic[42].

$$v=E_0(1-\exp(-k_T t)) \quad (2)$$

For studies as performed by Pandey *et al.*[12], maleimide-peptide alkylation assays were performed in a final volume of 200 µl in buffer C using 50 nM of the NFS1–ISD11 complex with or without an equimolar amount of FXN. The reactions were initiated with 2 eq. of L-cysteine (100 nM) and were incubated for 15 min at 30 °C. The reactions were stopped using 50 eq. of $MalP_{16}$ relative to free thiols (cysteine from proteins and L-cysteine) and 2% SDS. The reaction mixtures were incubated for 20 min at 30 °C. Half-reaction volumes were incubated with 1 µl of 100 mM DTT for 20 min at 25 °C. The samples (85 µl) were concentrated using a SpeedVac apparatus to 20–25 µl. The samples were analysed on 8% SDS–PAGE gels in non-reducing (without DTT) and reducing conditions (with DTT).

Cysteine desulfurase assays. The amount of L-alanine generated during the reaction was determined using L-ADH, which generates 1 equivalent of NADH per L-alanine consumed (denoted ADH assay in the text). The reactions were performed in buffer C and initiated using L-cysteine at various concentrations as indicated in the figure legends and incubated at 25 °C. Samples (10, 20 or 30 µl) were withdrawn from the solution at various time points and the reaction was stopped using TCA precipitation (0.8% final). After 5 min of incubation on ice, the samples were centrifuged at 14,500 r.p.m. for 4 min at room temperature and NaOH at a final concentration of 70 mM was added to neutralize TCA. The reaction mixtures were then centrifuged again at 14,500 r.p.m. for 4 min at room temperature. Each sample was analysed in a final volume of 100 µl containing NAD^+ (6 mM) and L-alanine dehydrogenase (1 U) in 50 mM $NaHCO_3$, pH 10. The kinetics of NADH formation was monitored at 340 nm during 20 min to reach completion. The curves were fitted assuming first-order kinetic[42] and the concentration of NADH corresponding to the total absorbance deviation at 340 nm was calculated using an extinction coefficient of $4{,}427\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (determined using L-alanine standard solutions).

For determination of the stoichiometry of the complexes by dose–response experiments (Supplementary Fig. 2f–h), the reaction was performed with 20 µM of the NFS1–ISD11 complex and increasing amounts of FXN and/or ISCU in the presence of 0.5 mM L-cysteine and 1 mM DTT. Unless indicated, the other ADH assays were performed with 20 µM of the NFS1–ISD11 complex and equimolar amounts of ISCU (WT and mutants) and/or FXN. For determination of the kinetic parameters, steady-state conditions were cautiously controlled. Accordingly, the rate of alanine production reaches a steady-state (linear variation) after ~1 min for the NIUF complexes and 20 min for the NIU complex (corresponding to the time required for persulfuration of ISCU). Steady-state conditions were achieved in all cases by (1) monitoring L-alanine production at four different time points to ensure that the rates are actually linear and (2) selecting reaction times to ensure that no more than 30% of L-cysteine or DTT were consumed. For L-cysteine, we considered that three L-cysteine molecules are consumed for each L-alanine generated, as cysteine is also consumed by the reduction process. The initial velocities were determined from the linear regression using these four different time points.

Fe-S cluster assembly. Fe-S cluster assembly reactions were performed under anaerobic conditions in a glove box. Before introduction into the glove box, all the proteins were deoxygenated by flushing the head space with argon and the buffer by bubbling argon inside. The NSF1–ISD11 complex (50 µM) was mixed with equimolar amounts of ISCU with or without FXN in buffer C at 25 °C. Then, 4 eq. of $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ were added and the solutions were incubated for 2 min. The reactions were initiated using 30 eq. of L-cysteine (1.5 mM) with or without DTT (1.5 mM) and transferred to a septum-sealed cuvette. Ultraviolet–visible spectra between 200 and 800 nm were recorded every minute on a Cary 100 (Varian) spectrometer at 25 °C.

Mass spectroscopy. The samples analysed by ESI-Q/TOF were prepared using 40 µM of the NFS1–ISD11 complex with or without equimolar amounts of ISCU and/or FXN in buffer C at 25 °C. The reactions were initiated with 10 eq. of L-cysteine (400 µM) and incubated for 3 min at 25 °C. The samples were buffer exchanged in 50 mM NH_4OAc, pH 7 buffer using micro-biospin6. Proteins were denatured for 5 min in 50% acetonitrile and 1% formic acid. Mass spectrometry measurements were performed with an electrospray Q/TOF mass spectrometer (Q/TOF Premier, Waters) equipped with the Nanomate device (Advion). Spectra were recorded with an estimated mass accuracy of ± 1 Da. The HD_A_384 chip (5 µm i.d. nozzle chip, flow rate range $100-500$ nl min^{-1}) was calibrated before use. For ESI − MS measurements, the Q/TOF instrument was operated in RF quadrupole mode with the TOF data being collected between *m/z* 300 and 2,990 for whole proteins. Collision energy was set to 6 eV and argon was used as the collision gas. The Mass Lynx 4.1 software was used for acquisition and data processing. Deconvolution of multiply charged ions was performed by applying the

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

MaxEnt1 algorithm. External calibration was performed with NaI clusters ($2\,\mu g\,\mu l^{-1}$, isopropanol/H_2O 50/50) in the acquisition *m/z* mass range.

The samples analysed by Orbitrap-MS/MS were prepared in buffer C using 20 μM of the NIU and NIUF complexes. The reactions were performed with L-cysteine (400 μM) in a final volume of 20 μl for 1 min with the NIUF complex and 1 h with the NIU complex. Controls without L-cysteine were also analysed. The reactions were stopped by adding 5 μl of buffer C containing 20 mM of IAA and were incubated for 15 min at 30 °C in the dark. The alkylation reaction continues by adding 100 μl of buffer C containing 8 M urea and 50 mM IAA and incubate 1 h at 30 °C in the dark. Excess IAA was removed by TCA precipitation as described for the alkylation assay. The protein pellets were resuspended in 20 μl of buffer C containing 8 M urea. The samples were diluted 8 × in buffer C and incubated with trypsin (2% of total protein mass) for 2 h at 37 °C. Protein digests were analysed by nano-liquid chromatography (nano-LC) ESI tandem mass spectrometry (MS/MS). These were carried out on a U3000 Dionex nanoflow system connected to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nanoelectrospray source. The samples were run through a C18 nanocolumn (75 μm i.d. × 50 cm, PepMap100 C18, 3 μm, 100 Å; Dionex) after being injected onto a pre-concentration column with a flow rate of $20\,\mu l\,min^{-1}$ of 0.1% TFA in water. Peptides were then loaded on the analytical column equilibrated with 0.1% of formic acid in water, and elution was carried out using a linear gradient from 2 to 60% of acetonitrile at a flow rate of $250\,nl\,min^{-1}$ for 60 min.

The mass spectrometer was operated in data-dependent mode to automatically switch between Orbitrap MS and MS/MS in the linear trap. Survey full scan MS spectra from 450 to 2,000 Da were acquired in the Orbitrap set to a resolution $R = 60{,}000$ at *m/z* 400, after accumulation of 500,000 charges on the linear ion trap. The ions with the most intense signals (up to six, depending on signal intensity) were sequentially isolated for fragmentation and analysis of fragments in the linear ion trap using CID. Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 s. MS/MS raw files were individually processed through a Proteome Discoverer v1.3 (PD1.3) (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) workflow. Identification of proteins and the search for post-translational modifications were done using the MASCOT search engine v2.4. For identification, a tolerance of 5 p.p.m. was used for the mass of the precursors and 0.8 Da for the mass of the fragments.

The estimation of the percentages of persulfuration of the peptides was performed by determination of the ratio of areas under the peaks of the chromatograms. The areas were obtained by extracting and integrating the mass intensity of each precursor identified. The percentages are reported as the ratio of persulfurated versus total amount of the corresponding peptide (persulfurated + unmodified) assuming that persulfuration does not modify the ionization properties of the peptide.

HPLC analysis. The products of the cysteine desulfurase reaction were analysed using HPLC. The reactions were performed in buffer C at 25 °C using 2 μM NFS1–ISD11 complex in a final volume of 300 μl. The reaction was initiated with a 750-fold excess of L-cysteine and was incubated for 1 h at 37 °C. The small molecules were separated from proteins using Amicon ultra (0.5 ml) with a cutoff of 10 kDa. The filtrate, containing the small molecules, was derivatized using the ACCQ-fluo reagent kit. The samples (5 μl) were injected at a flow rate of $1\,ml\,min^{-1}$, at 35 °C, on an AccQ-Tag column connected to an Alliance 2695 HPLC apparatus equipped with a fluo detector W2475. The separations were performed using a gradient as described by the manufacturer.

Statistical analysis and software. All the graphics from the figures, unless indicated, display one representative experiment. The kinetic parameters and s.e. reported in the tables were determined from at least three independent experiments. Prism 4.2 (GraphPad software) was used to fit the curves and generate the figures. ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft) was used to draw the molecules.

References

1. Campuzano, V. *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271,** 1423–1427 (1996).
2. Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* **11,** 2025–2036 (2002).
3. Puccio, H. *et al.* Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27,** 181–186 (2001).
4. Adamec, J. *et al.* Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 549–562 (2000).
5. Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y. & Fontecave, M. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.* **281,** 16256–16263 (2006).
6. Gakh, O. *et al.* Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum. Mol. Genet.* **15,** 467–479 (2006).
7. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. & Craig, E. A. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable *in vivo*. *EMBO Rep.* **5,** 1096–1101 (2004).
8. Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: a protein in search for a function. *J. Neurochem.* **126**(Suppl 1): 43–52 (2013).
9. Seguin, A. *et al.* Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1802,** 531–538 (2010).
10. Seznec, H. *et al.* Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* **14,** 463–474 (2005).
11. Colin, F. *et al.* Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135,** 733–740 (2012).
12. Pandey, A. *et al.* Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J. Biol. Chem.* **288,** 36773–36786 (2013).
13. Stehling, O., Elsasser, H. P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. & Lill, R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **13,** 3007–3015 (2004).
14. Tsai, C. L. & Barondeau, D. P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49,** 9132–9139 (2010).
15. Fontecave, M. & Ollagnier-de-Choudens, S. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **474,** 226–237 (2008).
16. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460,** 831–838 (2009).
17. Biederbick, A. *et al.* Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 5675–5687 (2006).
18. Fosset, C. *et al.* RNA silencing of mitochondrial m-Nfs1 reduces Fe-S enzyme activity both in mitochondria and cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **281,** 25398–25406 (2006).
19. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18,** 3981–3989 (1999).
20. Cai, K. *et al.* Human mitochondrial chaperone (mtHSP70) and cysteine desulfurase (NFS1) bind preferentially to the disordered conformation, whereas co-chaperone (HSC20) binds to the structured conformation of the iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU). *J. Biol. Chem.* **288,** 28755–28770 (2013).
21. Gerber, J., Muhlenhoff, U. & Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4,** 906–911 (2003).
22. Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. & Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22,** 4815–4825 (2003).
23. Schmucker, S. *et al.* Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS ONE* **6,** e16199 (2011).
24. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74,** 247–281 (2005).
25. Py, B. & Barras, F. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **8,** 436–446 (2010).
26. Adam, A. C., Bornhovd, C., Prokisch, H., Neupert, W. & Hell, K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* **25,** 174–183 (2006).
27. Shi, Y., Ghosh, M. C., Tong, W. H. & Rouault, T. A. Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **18,** 3014–3025 (2009).
28. Smith, A. D. *et al.* Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 11103–11104 (2001).
29. Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R. & Johnson, M. K. Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett.* **579,** 5236–5240 (2005).
30. Urbina, H. D., Silberg, J. J., Hoff, K. G. & Vickery, L. E. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **276,** 44521–44526 (2001).
31. Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C. L., Winn, A. M. & Barondeau, D. P. Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* **53,** 4904–4913 (2014).
32. Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A. & Barondeau, D. P. Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **51,** 2506–2514 (2012).
33. Adinolfi, S. *et al.* Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16,** 390–396 (2009).

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

34. Iannuzzi, C. *et al.* The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the E. coli IscU scaffold protein. *PLoS ONE* **6,** e21992 (2011).
35. Geoghegan, K. F. *et al.* Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a 'His tag' in *Escherichia coli*: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. *Anal. Biochem.* **267,** 169–184 (1999).
36. Pan, J. & Carroll, K. S. Persulfide reactivity in the detection of protein s-sulfhydration. *ACS Chem. Biol.* **8,** 1110–1116 (2013).
37. Chandramouli, K. *et al.* Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **46,** 6804–6811 (2007).
38. Kim, J. H., Frederick, R. O., Reinen, N. M., Troupis, A. T. & Markley, J. L. [2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *J. Am. Chem. Soc.* **135,** 8117–8120 (2013).
39. Sheftel, A. D. *et al.* Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107,** 11775–11780 (2010).
40. Kumar, C. *et al.* Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J.* **30,** 2044–2056 (2011).
41. Sipos, K. *et al.* Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* **277,** 26944–26949 (2002).
42. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* 3rd edn (Portland Press Ltd, 2004).
43. Behshad, E., Parkin, S. E. & Bollinger, Jr. J. M. Mechanism of cysteine desulfurase Slr0387 from *Synechocystis* sp. PCC 6803: kinetic analysis of cleavage of the persulfide intermediate by chemical reductants. *Biochemistry* **43,** 12220–12226 (2004).
44. Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T. & Esaki, N. Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J. Biochem.* **127,** 559–567 (2000).
45. Gakh, O. *et al.* Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **285,** 38486–38501 (2010).
46. Pandey, A., Yoon, H., Lyver, E. R., Dancis, A. & Pain, D. Identification of a Nfs1p-bound persulfide intermediate in Fe-S cluster synthesis by intact mitochondria. *Mitochondrion* **12,** 539–549 (2012).
47. Sen, N. *et al.* Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-kappaB mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell* **45,** 13–24 (2012).
48. Zhang, D. *et al.* Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53,** 575–581 (2013).
49. Flint, D. H. *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.* **271,** 16068–16074 (1996).
50. Ross-Inta, C., Tsai, C. Y. & Giulivi, C. The mitochondrial pool of free amino acids reflects the composition of mitochondrial DNA-encoded proteins: indication of a post-translational quality control for protein synthesis. *Biosci. Rep.* **28,** 239–249 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by CNRS/ICSN and by funds from the Ministerio de Economía y Competitividad (grant CTQ2010-21567-C02-01 and the project RNAREG, grant CSD2009-00080, funded under the programme CONSOLIDER INGENIO 2010), the Generalitat de Catalunya (2009SGR-208) awarded to A.G. and the ANR ERRed awarded to M.B.T. A.P. was a recipient fellow of PhD grant from ICSN/CNRS and X.E. was a recipient fellow of the MINECO. We are especially grateful to all the members of J.C. Drapier's team at ICSN for their help and assistance, to Dr H. Puccio for kindly providing the plasmids, Manuela Argentini, Véronique Henriot and Julia Jouaret from the SICaPS platform at IMAGIF (Gif Sur Yvette), Odile Thoison, Franck Pelissier and Suzanna Ramos at the HPLC facility, Alain Brunelle from the mass spectrometry laboratory of ICSN and Chantal Astier's team at CGM.

Author contributions

A.P. and B.D'.A. designed the experiments and A.P. performed most of the experiment. X.E. and A.G. planned the synthesis of the maleimide-peptide compounds and X.E. performed the synthesis. L.B. performed some enzymatic assays. D.C. and J.-P.L.C. performed mass spectrometry analyses, B.D'.A. and A.P. analysed the results. B.D'.A., M.B.T. and A.P. wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Parent, A. *et al.* Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat. Commun.* 6:5686 doi: 10.1038/ncomms6686 (2015).

© 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Résumé

L'ataxie de Friedreich est une maladie neurodégénérative sévère causée par un défaut d'expression de la frataxine (FXN), une petite protéine mitochondriale impliquée dans la biogenèse des centres fer-soufre (Fe/S), des groupements prosthétiques aux fonctions cellulaires essentielles. Chez les mammifères, il a été montré que la frataxine stimule la synthèse *in vitro* de centres Fe/S sur la protéine d'échafaudage ISCU, grâce à l'augmentation de la production d'ions sulfures par le complexe NFS1-ISD11-ISCU. Cependant, le mécanisme par lequel la frataxine active la biogenèse des centres Fe/S n'a pas encore été défini. Nous avons étudié les effets de FXN sur les cinétiques de formation et de réduction des persulfures, des intermédiaires clés de la production d'ions sulfures, générés par la cystéine désulfurase NFS1, à l'aide d'un test de détection des persulfures basé sur l'utilisation de composés synthétiques peptide-maléimide et de la spectrométrie de masse. Nous avons montré que FXN active deux réactions très similaires : le transfert de soufre de NFS1 vers ISCU, conduisant à l'accumulation d'un persulfure sur la cystéine C104 d'ISCU et un transfert de soufre de NFS1 vers des réducteurs à thiol comme le DTT, la L-cystéine et le glutathion, conduisant à la forme persulfurée de ces réducteurs. Nous avons constaté que la vitesse de réduction du persulfure d'ISCU par les thiols n'est pas affectée en présence de FXN et que ce persulfure est réduit plus lentement que celui de NFS1. Nous avons corrélé l'activation par FXN de la réduction du persulfure de NFS1 par les thiols à une stimulation de l'assemblage d'un centre Fe/S sur ISCU. Dans nos conditions expérimentales, l'atome de soufre du persulfure d'ISCU n'est pas incorporé dans le centre Fe/S synthétisé, mais nos résultats ne permettent pas d'exclure que ce persulfure puisse être réduit par une réductase dédiée, encore non identifiée. L'ensemble de nos données indiquent que le rôle de la frataxine est de contrôler la réduction du persulfure de NFS1, en augmentant les vitesses de transfert de soufre vers ISCU et vers de petites molécules à thiol.

Abstract

Friedreich ataxia is a severe neurodegenerative disease caused by reduced expression of frataxin (FXN), a small mitochondrial protein involved in iron-sulfur (Fe/S) cluster biogenesis which are prostetic groups with essential cellular functions. It has been shown *in vitro* that mammalian FXN activates Fe/S cluster synthesis on the scaffold protein ISCU, by rising up suflide ion production by NFS1-ISD11-ISCU complex. However, the mechanism by which frataxin stimulates Fe/S cluster biogenesis has not been yet defined. We have studied the effect of FXN on the kinetics of formation and reduction of persulfides that are key intermediates of sulfide ion production generated by NFS1, using mass spectrometry and a new detection assay for persulfide based on gel-mobility shift following alkylation by maleimide-peptide compounds. We demonstrate that frataxin activates two similar reactions : sulfur transfer from cysteine desulfurase NFS1 to ISCU leading to accumulation of a persulfide on ISCUcysteine C104 and reduction of NFS1 persulfide by thiol reducers such as DTT, L-cysteine and glutathion. We have observed that FXN does not stimulate the rate of ISCU persulfide reduction by thiols and that this persulfide is reduced much more slowly than NFS1 persulfide. We have then correlated the reduction of NFS1 persulfide with Fe/S cluster assembly. Under our experimental conditions, the sulfur from ISCU persulfide is not incorporated into the Fe/S cluster. However, we cannot exclude that an as yet not identfiied reductase could reduces ISCU persulfide and trigger Fe/S cluster assembly. Overall, our data point to a regulatory function of FXN as an enhancer of persulfide reduction, stimulating the rates of sulfur transfer to ISCU and NFS1 persulfide.

Mots clés : biogenèse des centres Fe/S, frataxine, Ataxie de Friedreich, persulfures, mécanisme, mammifères, mitochondrie,