



HAL
open science

Aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes : importance de la dynamique structurale au cours de la catalyse

Raphaël Bchini

► **To cite this version:**

Raphaël Bchini. Aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes : importance de la dynamique structurale au cours de la catalyse. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0254 . tel-01749637

HAL Id: tel-01749637

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749637>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Raphaël Bchini

**Aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes :
Importance de la dynamique structurale au cours de la catalyse**

Le 5 décembre 2012

MEMBRES DU JURY :

PRESIDENT :

M. Eric Gelhaye

Professeur, Université de Lorraine, Nancy

RAPPORTEURS :

Mme Corinne Lionne

Chargée de recherche, HDR, CNRS/CPBS Montpellier

M. Fernando Rodrigues-Lima

Professeur, Université Paris Diderot-Paris 7

EXAMINATEURS :

Mme Isabelle André

Directrice de recherche, CNRS, INSA ,Toulouse

M. François Talfournier

**Maître de conférence, HDR, Université de Lorraine, Nancy,
Directeur de thèse**

Mme Sophie Rahuel-Clermont

**Chargée de recherche, HDR, Université de Lorraine, Nancy,
Co-directeur de thèse**

INVITE :

M. Guy Branlant

Professeur émérite, Université de Lorraine, Nancy

Remerciements

Cette thèse est la concrétisation d'un travail de recherche qui a été marqué par de nombreux évènements, de joie et de tristesse intenses. De nombreuses personnes m'ont accompagné tout au long de cette aventure jusqu'ici.

Je tiens à remercier Madame Christiane Branlant, Directrice de l'UMR CNRS-UL 7214 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire AREMS.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur émérite Guy Branlant, responsable de l'équipe d'Enzymologie Moléculaire et Structurale qui m'a accordé sa confiance en m'acceptant dans son équipe, et en acceptant de me faire l'honneur de participer au jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Corinne Lionne, Chargé de recherche à Montpellier, et à Monsieur Fernando Rodrigues-Lima, Professeur à l'Université de Paris 7, qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Madame Isabelle André, Directrice de recherche à Toulouse, et Monsieur Eric Gelhaye, Professeur à l'Université de Lorraine à Nancy, qui ont accepté de juger ma thèse.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Docteur François Talfournier, mon directeur de thèse, et Madame le Docteur Sophie Rahuel-Clermont, ma co-directrice de thèse, qui m'ont encadré depuis mon M2R et jusqu'à l'aboutissement de ma thèse et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Pour leurs conseils, les discussions scientifiques (les casques en mousses s'en souviennent !) ou privées, leur rigueur, l'aide et le temps qu'ils m'ont consacrés, ne serait-ce que pour me remettre le pied à l'étrier, je ne les remercierai jamais assez.

Merci aux Professeurs Sandrine Boschi-Muller et Kira Weissman et aux Docteurs Hortense Mazon, Christophe Jacob, Arnaud Gruez, Benjamin Chagot, avec qui les discussions ont toujours été enrichissantes... ou délirantes !

Je remercie tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou discuter. Je pense, entre autres, à Sabrina, Baptiste (le p'tit poulet), Xav' & Laure, Séverine, qui ont pu me soutenir pendant des moments difficiles.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire, passées et présentes, pour leur sympathie et leur bonne humeur.

Ma thèse n'aurait pas été la même sans le soutien de Seb & Maud et leur petite Lou, ainsi que Jérôme.

J'adresse mes remerciements au Docteur Jean-Christophe Lacour et toute l'équipe du service de neurologie du CHU de Nancy ainsi que le centre de rééducation de Lay-St-Christophe, qui m'ont permis de pouvoir continuer ma thèse. J'associe également les personnes qui m'ont énormément soutenu, François, Sophie, Sab, Baptiste, Xav' & Laure, Sév'.

Enfin, j'adresse mes plus vifs remerciements à ma femme Béatrice, qui m'a supporté jusqu'au bout et encouragé et surtout pendant les moments les plus difficiles. J'associe à ces remerciements sa famille ainsi que la mienne.

A mon papa, qui est parti beaucoup trop tôt et à qui je dédie ma thèse,

*A ma femme Béatrice,
En témoignage de tout mon amour,*

A mon fils Alexandre, né le 8 juin 2010,

*A ma maman,
Avec toute ma tendresse,*

*A mes frères Nicolas et Damien,
Avec toute mon affection,*

A tous mes amis,

A tous, Merci !

Sommaire

Abréviations

Avant-propos

<i>Etude bibliographique</i>	1
1. Rôles biologiques et métabolisme des aldéhydes	1
1.1. Rôles bénéfiques	2
1.1.1. La bétaine aldéhyde	2
1.1.2. Le succinate semialdéhyde	5
1.1.3. Le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P)	7
1.1.4. Le méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et le malonate semialdéhyde (MSA)	8
1.1.5. Le rétinaldéhyde (rétinal) et les rétinoïdes	10
1.2. Effets toxiques	13
1.2.1. Les ALDH comme polluants environnementaux	13
1.2.2. Les aldéhydes générés par la peroxydation des lipides	15
1.2.3. Lien entre alcoolisme et toxicité cellulaire	16
2. Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)⁺	19
2.1. Rôles physiologiques	21
2.1.1. Rôles physiologiques de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (GAPN)	21
2.1.2. Rôles physiologiques des Rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH)	22
2.1.3. ALDH CoA-dépendantes	23
2.2. Structure	24
2.2.1. Structure du monomère	24
2.2.1.1. Domaine et mode liaison du cofacteur	24
2.2.1.2. Domaine catalytique	27
2.2.2. Organisation quaternaire	28
2.3. Mécanismes réactionnels	29
2.3.1. Mécanismes cinétiques	29
2.3.2. Mécanismes catalytiques	29

2.3.2.1.	ALDH hydrolytiques	29
2.3.2.2.	ALDH CoA-dépendantes	32
2.3.3.	Importance de la dynamique au cours de la catalyse	34
2.3.3.1.	Formation d'un complexe michaélien compétent	34
2.3.3.2.	Dynamique conformationnelle du cofacteur	36
<i>Objectifs</i>		39
<i>Résultats</i>		
<i>PARTIE 1 : Bases moléculaires de la reconnaissance du rétinol</i>		
<i>par les RALDH</i>		40
1. Contexte et objectif général		40
2. Travaux préliminaires		41
2.1. Clonage, production et purification		41
2.1.1. RALDH1 humaine		41
2.1.2. RALDH2 de rat		43
2.2. Mise au point des conditions d'études de la réaction d'oxydation du rétinol par les RALDH		44
3. Stratégie expérimentale et principaux résultats		46
<i>Publication 1</i>		48
<i>PARTIE 2 : Caractérisation de la dynamique du processus d'isomérisation conformationnelle du cofacteur réduit au cours de la catalyse</i>		74
1. Stratégie : les propriétés de fluorescence du NADH constituent une sonde conformationnelle		74
1.1. Propriétés de fluorescence du NADH au sein d'un complexe binaire avec la RALDH2		74

1.2. Propriétés enzymatiques de la RALDH2 avec l'analogue de substrat décanal	76
2. Identification du résidu Trp responsable du signal spectroscopique associé à l'isomérisation du NADH	78
2.1. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire	80
2.2. Cinétiques à l'état préstationnaire	81
3. Modélisation cinétique du cycle catalytique de la RALDH2	84
3.1. Principe et intérêt de l'ajustement global des données expérimentale	85
3.2. Analyse	87
<i>PARTIE 3 : Impact du mode de stabilisation du cofacteur sur le mécanisme cinétique des ALDH</i>	91
<i>Publication 2</i>	93
<i>Discussion et perspectives</i>	109
<i>Matériels et Méthodes</i>	118
<i>Références bibliographiques</i>	132

Abréviations

Abréviations

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
ϵ	coefficient d'extinction molaire
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
AKR	aldo-cétoréductase
AR	acide rétinoïque
BADH	bétaïne aldéhyde déshydrogénase
CoA	coenzyme A
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
dNTP	désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO _x	densité optique à x nm
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FA	formaldéhyde
FPLC	chromatographie en phase liquide à moyenne pression
FRET	Transfert Résonnant d'Energie de Fluorescence
G3P	glycéraldéhyde-3-phosphate
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAD	glutamate décarboxylase
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphorylante
GAPN	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante
GHB	γ -hydroxybutyrate
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactosidase
k_{cat}	constante catalytique
K_M	constante de Michaelis
k_{off}	constante de vitesse associée à la dissociation du cofacteur
LB	Luria Bertani
LDA	aldéhydes dérivés de lipides
MDA	malondialdéhyde
MMSA	méthylmalonyl semialdéhyde
MSA	malonate semialdéhyde
MSDH	méthylmalonyl semialdéhyde déshydrogénase
NAD(P)(H)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme réduite)
NMN(H)	nicotinamide mononucléotide (forme réduite)
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Protein Data Bank
pK_{app}	pK_A apparent
PM	poids moléculaire
<i>Pfu</i>	ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
p/v	poids/volume
RALDH	rétinal déshydrogénase

RAR	" retinoic acid receptor "
RARE	retinoic acid response element
RDH	retinol déshydrogénase
Rétinaldéhyde	<i>tout-trans</i> rétinaldéhyde
RXR	" retinoid X receptor "
SA	sulfate d'ammonium
SDR	" short chain dehydrogenase "
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
UV	ultra-violet
WT	enzyme de type sauvage

Avant-propos

L'étude d'enzymes de la superfamille des Aldéhyde déshydrogénases figure parmi les projets de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale du laboratoire AREMS depuis sa création. La caractérisation des bases moléculaires impliquées dans la catalyse, les spécificités structurales (de substrat ou d'accepteur d'acyle) et les propriétés de coopérativité de ces enzymes multimériques, constituent une des thématiques principales de notre équipe depuis de nombreuses années. D'abord consacrées aux Aldéhyde déshydrogénases phosphorylantes comme la GAPDH, ces études ont été orientées vers les Aldéhyde déshydrogénases non-phosphorylantes hydrolytiques comme la GAPN puis CoA-dépendantes comme la MSDH. Ces travaux ont abouti à la description détaillée des mécanismes catalytiques de ces enzymes, dont un trait marquant et convergent avec les travaux d'autres équipes, est l'importance de la flexibilité et de la dynamique conformationnelle dans le site actif au cours de la catalyse, incluant les chaînes latérales d'acides aminés, le substrat et le cofacteur.

Au cours de ma thèse, j'ai abordé différentes déclinaisons de cette question, concernant 1) la formation d'un complexe covalent efficace au début du cycle catalytique, dans le cas de la reconnaissance du rétinol par les rétinol déshydrogénases, 2) la caractérisation d'un processus d'isomérisation du cofacteur réduit au cours de la réaction, et 3) les déterminants structuraux responsables des différences de mécanisme enzymatique entre les ALDH hydrolytiques et CoA-dépendantes impliquant l'étape de dissociation du cofacteur réduit.

Après une partie Introduction rappelant les données accumulées sur la structure, le mécanisme et les aspects dynamiques de la catalyse, ces trois projets constituent les chapitres présentés dans la partie Résultats de mon manuscrit, en partie sous forme de publications. Une partie Discussion-Perspectives présente une synthèse et une discussion plus approfondie de ces résultats. Une partie Matériels et Méthodes détaille les protocoles et techniques utilisés qui ne sont pas décrits dans les publications.

*Etude
bibliographique*

1. Rôles biologiques et métabolisme des aldéhydes

Les aldéhydes sont des molécules ubiquitaires qui dérivent *in vivo* de la biotransformation de nombreux composés endogènes ou exogènes. Les aldéhydes d'origine exogène résultent de la biotransformation de substances xénobiotiques ou d'origine alimentaire, et d'agents environnementaux. Les aldéhydes d'origine endogène sont formés au cours du métabolisme à partir d'un grand nombre de composés comme les acides aminés, les oses, les lipides, les amines biogéniques et les stéroïdes (Lindahl, 1992).

Les aldéhydes sont des entités extrêmement réactives qui présentent des effets biologiques antagonistes. En effet, leur rôle prépondérant est illustré par leur implication dans un grand nombre de voies métaboliques où ils représentent des intermédiaires réactionnels clés, comme par exemple le glycéraldéhyde-3-phosphate dans la glycolyse. Par contre, le caractère électrophile de la fonction aldéhyde rend ces entités potentiellement toxiques car elles peuvent réagir avec des fonctions nucléophiles (amines et thiols) de diverses biomolécules (protéines, lipides, acides nucléiques, oses aminés) pour former des adduits covalents intra- ou inter-moléculaires. L'accumulation de ces dérivés peut être à l'origine de dysfonctionnements cellulaires conduisant au développement de diverses pathologies (cancers, diabète, maladies cardiovasculaires et maladies neurodégénératives). A l'opposé des radicaux libres, les aldéhydes sont des entités à durée de vie relativement longue, et peuvent donc réagir avec leurs cibles à distance après diffusion ou transport (Marchitti *et al.*, 2008). Au niveau cellulaire, il n'est donc pas surprenant que plusieurs familles d'enzymes soient capables de métaboliser les aldéhydes, parmi lesquelles (figure 1 p. 2):

- les aldéhyde oxydases à cofacteur flavine et molybdoptérine (AOX) qui catalysent l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons ;
- les aldo-cétoréductases à cofacteur NAD(P) (AKR) qui métabolisent un large spectre d'aldéhydes en catalysant de façon réversible leur réduction en alcools ;
- les alcool déshydrogénases sont des métalloenzymes à Zn^{2+} et à cofacteur NAD (ADH) qui peuvent réduire ou oxyder les aldéhydes ;
- les cytochromes P450 (CYP450) sont des hémoprotéines qui catalysent la monooxygénation d'aldéhydes à partir d'oxygène moléculaire et constituent une famille essentielle d'enzymes de détoxification de phase 1 ;
- les glutathion-S-transférases (GST) sont impliquées dans les voies de détoxification de phase 2 en catalysant la conjugaison d'une large gamme d'aldéhydes au glutathion permettant ainsi l'excrétion de ces composés ;

Etude bibliographique

- les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P) (ALDH), qui font l'objet de ce travail, interviennent aussi bien dans le métabolisme que dans les processus de détoxification.

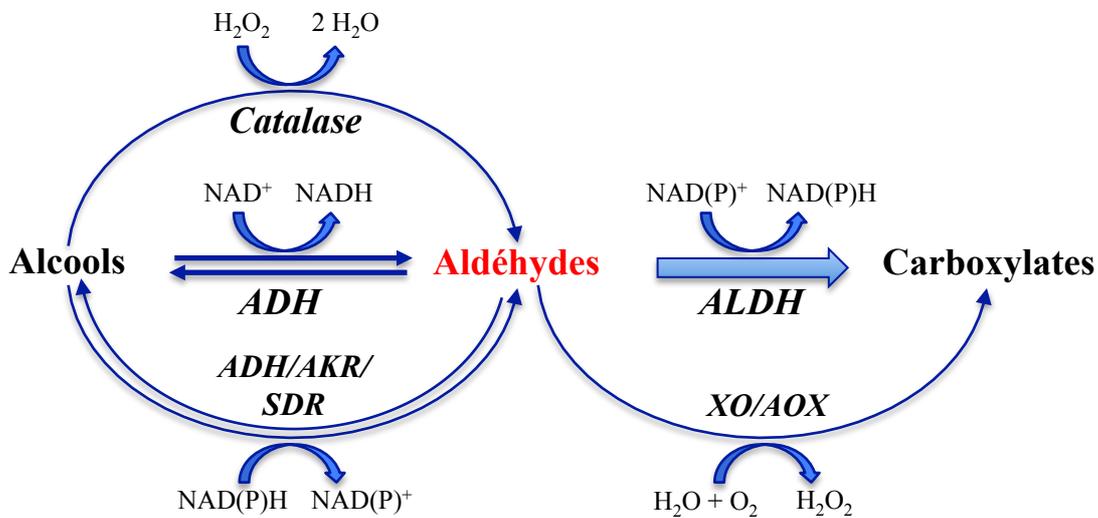


Figure 1 : Vue d'ensemble simplifiée du métabolisme des aldéhydes (d'après Marchitti *et al.*, 2008).

Abréviations : ADH, Alcool déshydrogénase ; AKR, Aldo-cétoréductase ; SDR, Short chain dehydrogenase/reductase ; ALDH, Aldéhyde déshydrogénase ; XO, Xanthine oxydase ; AOX, Aldéhyde oxydase.

1.1. Rôles bénéfiques

Les aldéhydes interviennent dans de nombreux processus cellulaires et représentent des intermédiaires clés aussi bien dans les voies anaboliques que cataboliques. C'est le cas par exemple de la bêtaïne aldéhyde, qui est un intermédiaire dans la biosynthèse d'un osmoprotectant, la glycine bêtaïne et du succinate semialdéhyde, issu du catabolisme d'un neurotransmetteur, l'acide γ -aminobutyrique (GABA). En relation avec mon projet de thèse, les rôles du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), du méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et du rétinaldéhyde seront également développés.

1.1.1. La bêtaïne aldéhyde

La bêtaïne aldéhyde est un intermédiaire obligatoire dans la synthèse de la glycine bêtaïne (parfois dénommée bêtaïne), qui assume différents rôles en tant que 1) soluté osmoprotecteur majeur chez les procaryotes et les eucaryotes, 2) donneur de groupement méthyle *via* des réactions de transméthylation impliquées dans la biosynthèse de méthionine, et 3) intermédiaire dans le catabolisme de la choline et précurseur de choline dans certaines bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Rhodes et Hanson, 1993 ; Huang *et al.*, 2000 ; Craig, 2004 ; Munoz-Clares *et al.*, 2010).

En tant qu'osmolyte, la glycine bêtaïne peut s'accumuler à de fortes concentrations pour jouer son rôle de protection des cellules, des protéines et des enzymes vis-à-vis du stress osmotique généré par le froid, la sécheresse, le gel et la forte salinité (Huang *et al.*, 2000), en particulier chez les plantes pour lesquelles ce stress représente une limitation majeure de la production agricole (Fitzgerald *et al.*, 2008). Chez l'Homme, des pathologies sont souvent associées à des désordres métaboliques faisant intervenir la glycine bêtaïne, au niveau vasculaire, artériel, cérébral et hépatothique (Cravo et Camilo, 2000 ; Lever et Slow, 2010). En effet, l'adaptation au stress osmotique, induite par la présence de la glycine bêtaïne, protège de nombreuses cellules contre une apoptose prématurée. En tant que donneur de méthyle, la glycine bêtaïne est catabolisée *via* des réactions de transméthylation au cours du cycle de la méthionine qui se produit dans les cellules hépatothiques, rénales et dans les mitochondries (figure 2).

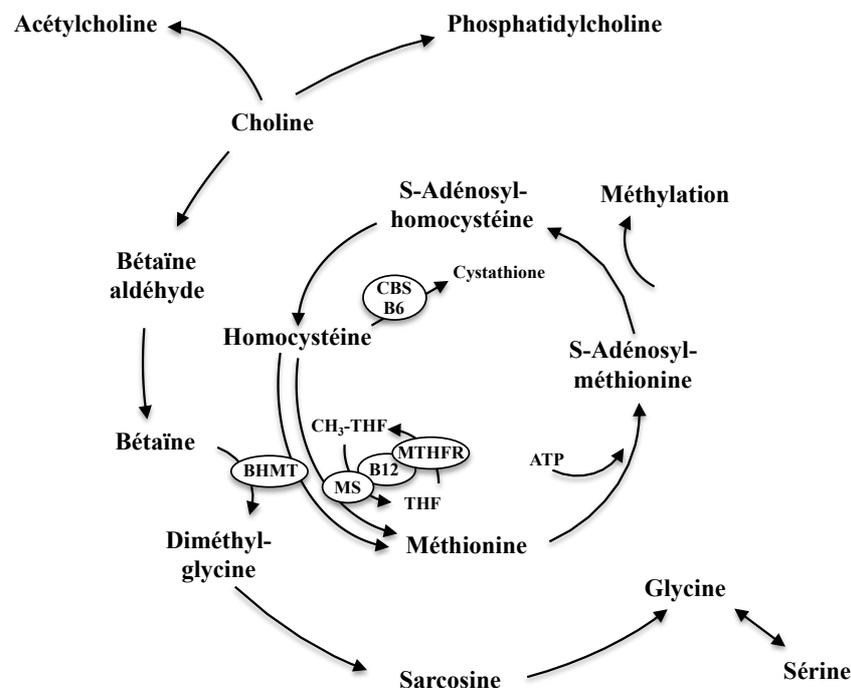


Figure 2 : La glycine bêtaïne et la transméthylation dans le cycle de la méthionine (d'après Craig, 2004).

Abréviations : B6, vitamine B6 ; B12, vitamine B12 (cobalamine) ; BHMT, bêtaïne homocystéine méthyltransférase ; CBS, cystathionine β-synthase ; MS, méthionine synthase ; MTHFR, méthylène-tétrahydrofolate réductase ; THF, tétrahydrofolate ; CH₃-THF, 5-méthyl-tétrahydrofolate

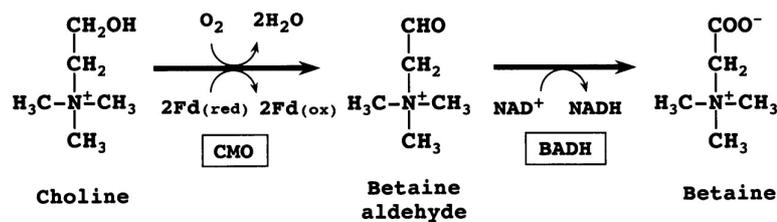
Par exemple, la bêtaïne intervient dans la conversion de l'homocystéine en méthionine et donc dans la production de S-Adénosyl-méthionine (SAM) qui joue notamment le rôle de cofacteur de méthylation. Des concentrations élevées d'homocystéine et faibles de SAM sont associées à des pathologies chroniques, comme l'hyperhomocystéinémie qui est associée à des problèmes cardiovasculaires, des démences, la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à d'autres désordres métaboliques

Etude bibliographique

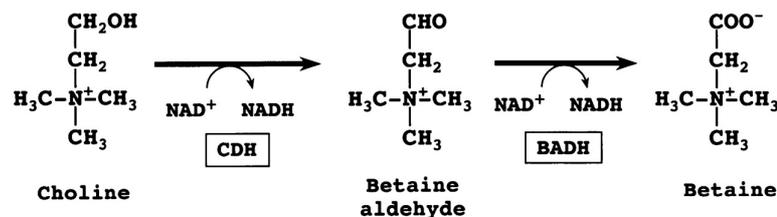
(Craig, 2004). Enfin, il est à noter que la glycine bêtaïne ou ses dérivés sont utilisés comme tensioactifs à l'échelle industrielle (cosmétiques par exemple) (Lever *et al.*, 2007 ; Likes *et al.*, 2007).

Dans la plupart des organismes, la production de glycine bêtaïne résulte de l'oxydation de la choline. Cette oxydation se fait en deux étapes, *via* un intermédiaire toxique, la bêtaïne aldéhyde (figure 3). Chez les plantes, la voie de synthèse fait intervenir deux enzymes : une choline monooxygénase et une bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH). Dans les cellules de mammifères et dans des bactéries comme *Escherichia coli*, la glycine bêtaïne est synthétisée par la choline déshydrogénase et une BADH. En comparaison à ces deux systèmes, une flavoenzyme capable de catalyser à la fois l'oxydation de la choline et celle de la bêtaïne aldéhyde a été identifiée chez certains microorganismes comme *Arthrobacter globiformis* (Fitzgerald *et al.*, 2008 ; Sakamoto et Murata, 1999 ; Ikuta *et al.*, 1977).

1. Plantes



2. *Escherichia coli*



3. *Arthrobacter globiformis*

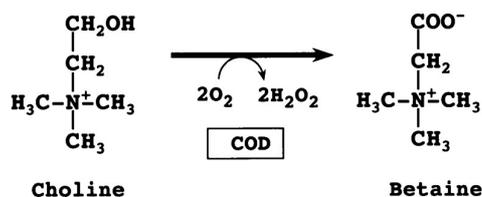


Figure 3 : Exemple de voies de biosynthèse de la bêtaïne utilisant la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) (d'après Sakamoto et Murata, 1999).

Abréviations : CMO, choline monooxygénase ; CDH, choline déshydrogénase ; Fd (red) et Fd (ox), formes réduite et oxydée de la ferredoxine ; COD, choline oxydase

Hormis leur implication dans la biosynthèse de la glycine bêtaïne, les BADH peuvent également accepter d'autres ammonium quaternaires et sulfonium tertiaires ainsi que certains aminoaldéhydes, ce qui suggère leur implication dans d'autres voies métaboliques comme la dégradation des polyamines, la synthèse de la carnithine et chez les plantes la synthèse d'autres osmoprotectants (Chern et Pietruszko, 1995 ; Lin *et al.*, 1996 ; Pietruszko *et al.*, 1997 ; Livingstone *et al.*, 2003).

1.1.2. Le succinate semialdéhyde

Le succinate semialdéhyde est un intermédiaire clé dans le catabolisme de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), neurotransmetteur inhibiteur majoritaire du système nerveux central. L'inhibition de la transmission de l'influx nerveux entre deux neurones est la conséquence de la libération du GABA dans la fente synaptique, suivie de sa fixation sur des récepteurs spécifiques (Gibson, 2005) (figure 4).

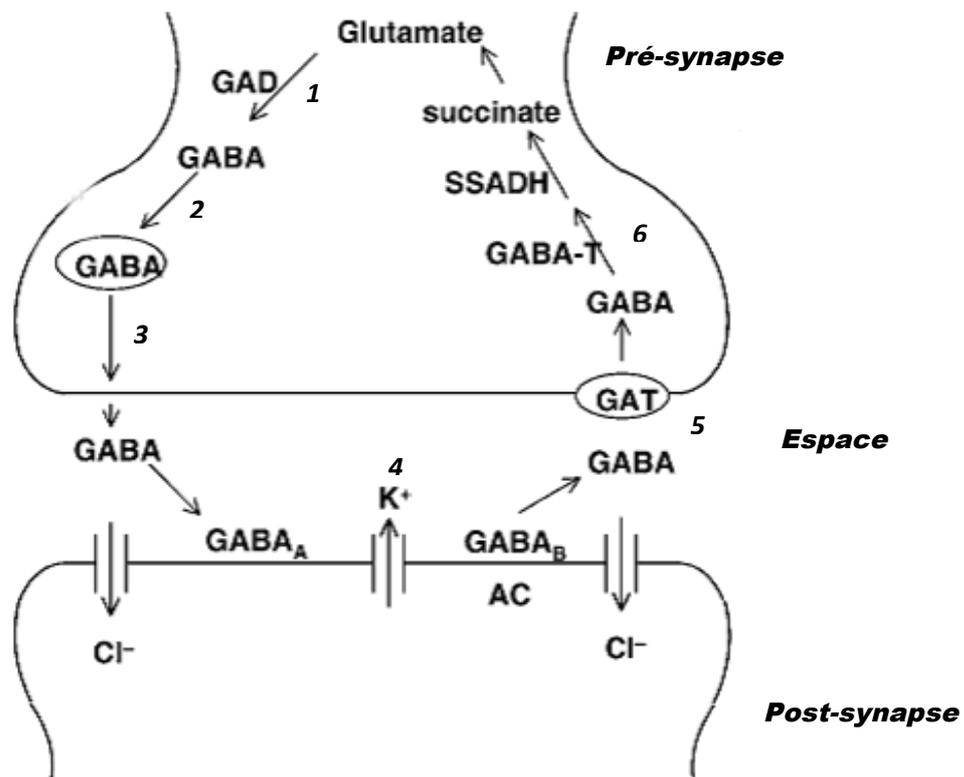


Figure 4 : Mécanisme de synthèse/dégradation de l'acide γ -aminobutyrique lors de la transmission de l'influx à travers une synapse GABAergique (d'après Gibson, 2005).

1 : synthèse de GABA catalysée par l'acide glutamique décarboxylase (GAD) ; 2 : incorporation du GABA dans une vésicule (processus ATP-dépendant) ; 3 : relargage du GABA dans l'espace inter-synaptique par fusion de la vésicule avec la membrane pré-synaptique ; 4 : fixation du GABA à la membrane post-synaptique *via* les récepteurs GABA_A et GABA_B ; 5 : incorporation du GABA dans une vésicule par un GABA transporteur (GAT) sur la membrane pré-synaptique ; 6 : dégradation du GABA en succinate avec, éventuellement, resynthèse de glutamate. GABA-T : GABA transaminase, SSADH : succinate semialdéhyde déshydrogénase, AC : adénylate cyclase.

Etude bibliographique

Le GABA est principalement synthétisé par décarboxylation du glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur. Celle-ci est assurée par la glutamate décarboxylase (GAD), localisée dans la fraction cytosolique des terminaisons axonales GABAergiques, et également par l'ALDH9, appartenant à la famille des BADH, qui catalyse l'oxydation du γ -aminobutyraldéhyde issu du catabolisme de la putrescine (Vaz *et al.*, 1999). Après recapture par les neurones, le GABA est recyclé en glutamate (le "GABA shunt", Waagepetersen *et al.*, 1999) ou dégradé en succinate par l'intervention de la GABA transaminase conduisant à la formation de succinate semialdéhyde. Il est ensuite métabolisé soit en succinate par la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) pour entrer dans le cycle de Krebs, soit en γ -hydroxybutyrate (GHB) par une succinate réductase (Fait *et al.*, 2005 ; figure 5).

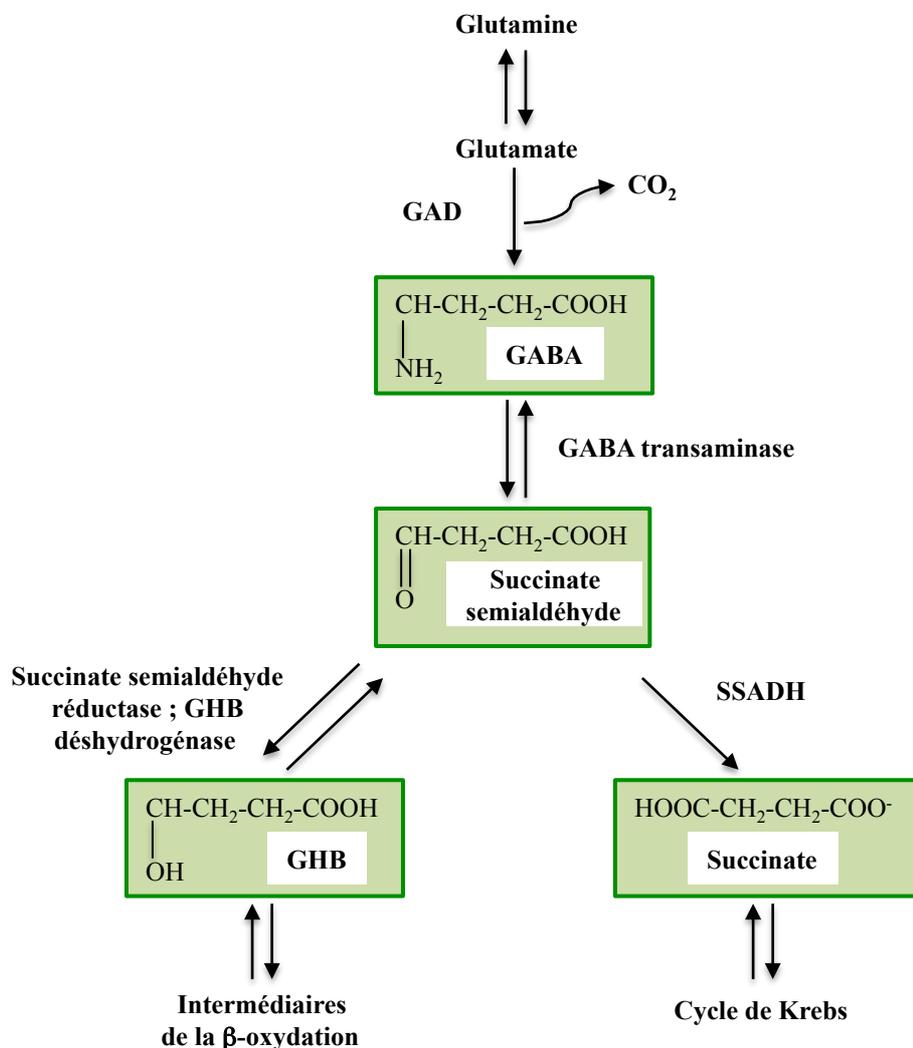


Figure 5 : La voie de dégradation du GABA (acide γ -aminobutyrique) (d'après Fait *et al.*, 2005).
Abréviations : GAD, glutamate décarboxylase ; GHB, γ -hydroxybutyrate ; SSADH, succinate semialdéhyde déshydrogénase.

Une déficience en SSADH, maladie génétique autosomale récessive rare, conduit à l'accumulation de GHB. Cette maladie se traduit par des troubles cliniques sévères comme des retards intellectuels, des états d'hypotonie et d'ataxie, ou encore des troubles du comportement comme, entre autres, des états d'anxiété et d'épilepsie (Gibson *et al.*, 2003 ; Pearl *et al.*, 2011). Par ailleurs, les propriétés neuropharmacologiques du GHB, un acide gras monocarboxylique capable de traverser la barrière céphalorachidienne, sont utilisées à des fins médicales dans le cadre d'anesthésies, de traitements des troubles du sommeil (insomnies, parasomnie, narcolepsie), et d'états de manque relatifs à la dépendance à l'alcool ou l'opium (Bekri *et al.*, 2004). En effet, à faible dose, sa capacité à induire des effets sédatifs, anesthésiants ou euphorisants est probablement liée à une inhibition du relargage du GABA ou de la dopamine au niveau présynaptique (Gibson *et al.*, 2003). Par contre, le GHB est également devenu célèbre en tant que « drogue du viol » ces dernières années (Schneir *et al.*, 2001).

1.1.3 Le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P)

Le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) est un intermédiaire essentiel du métabolisme central chez les bactéries et les eucaryotes permettant l'interconnexion des trois voies de catabolisme du glucose. La voie d'Embden-Meyerhof, dite de la glycolyse, est caractéristique des eucaryotes et d'un grand nombre de bactéries anaérobies strictes ou facultatives. Dans ce cas, le G3P est généré à partir du fructose-1,6-biphosphate par l'aldolase qui conduit également à la formation de dihydroxyacétone phosphate converti ensuite en G3P par la triose phosphate isomérase. Le G3P est alors oxydé en pyruvate par différents systèmes enzymatiques. Cependant, la phosphofructokinase, une enzyme clé de cette voie, est absente dans la plupart des bactéries aérobies dans lesquelles le glucose est alors catabolisé suivant la voie d'Entner-Doudoroff. Dans ce cas, le G3P est issu du clivage du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Enfin, une troisième voie est présente à la fois chez les bactéries et les eucaryotes, la voie des pentoses phosphates, dont la principale fonction est de générer du NADPH et des carbohydrates en C4 et C5, permettant ainsi de nombreuses biosynthèses. Le rôle central du G3P dans la séquence métabolique conduisant des trioses au pyruvate, qui peut être considérée comme la véritable voie centrale du métabolisme du glucose (Cooper, 1986), est illustré dans la figure 6 p. 8. Par contre, les *archae* utilisent des versions modifiées des voies d'Embden-Meyerhof et d'Entner-Doudoroff et dans certains cas, le G3P n'est plus impliqué dans la production de pyruvate.

Le G3P est également impliqué dans des voies anaboliques comme la néoglucogénèse (Siebers et Schönheit, 2005), mais aussi dans la biosynthèse du tryptophane (Payne *et al.*, 1987).

Etude bibliographique

Chez les végétaux, lors de la photosynthèse dans le stroma du chloroplaste, le G3P intervient dans l'export d'équivalents réducteurs NADPH vers le cytosol (Fliege *et al.*, 1978).

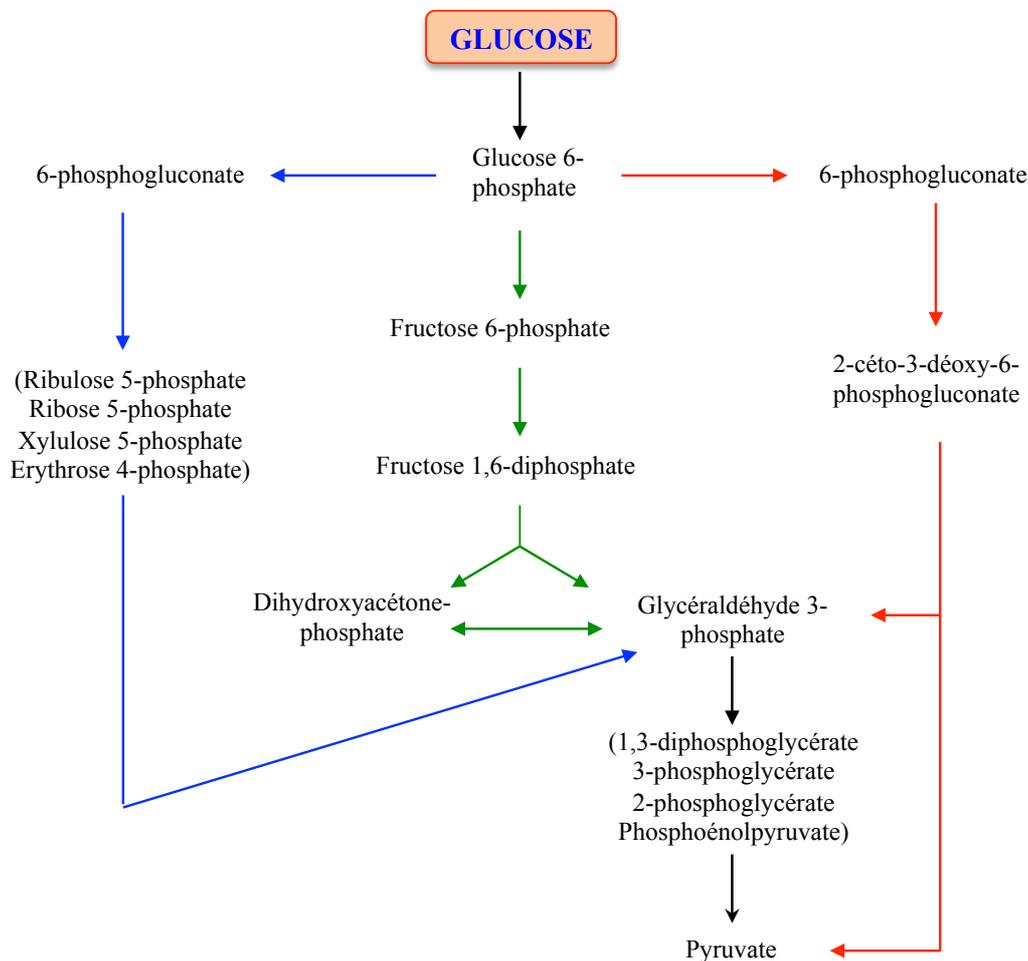


Figure 6 : Les trois principales voies de dégradation du glucose (d'après Leclerc *et al.*, 1995).

La voie en vert correspond à la glycolyse, également appelée voie d'Embden-Meyerhof, la voie en bleu correspond à la voie des pentoses phosphates et la voie en rouge à la voie du 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate (KDPG) dite d'Entner-Doudoroff.

1.1.4 Le méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et le malonate semialdéhyde (MSA)

Le méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et le malonate semialdéhyde (MSA) sont respectivement impliqués dans le catabolisme de la valine et des bases pyrimidiques. Chez les bactéries comme chez les eucaryotes, le catabolisme des acides aminés branchés (valine, isoleucine et leucine soit trois des neuf acides aminés essentiels chez les mammifères) se décompose en deux parties : une partie proximale commune à ces trois acides aminés, et une partie distale spécifique de chacun (Massey *et al.*, 1976 ; Harper *et al.*, 1984) (figure 7 p. 9). Dans la partie commune, la première réaction consiste en la transamination réversible des trois acides

aminés, conduisant aux 2-cétoacides correspondants. Cette réaction est suivie d'une décarboxylation oxydative irréversible des intermédiaires obtenus par un complexe cétoacide déshydrogénase. La partie distale du métabolisme de la valine conduit à la formation du MMSA, qui subit ensuite une décarboxylation oxydative catalysée par la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH) pour former le propionyl-CoA. Celui-ci est ensuite utilisé pour synthétiser le succinyl-CoA, qui est un intermédiaire du cycle de Krebs, *via* notamment l'intervention de la propionyl-CoA carboxylase, dont l'absence d'activité est responsable de pathologies telles que l'acidémie propionique dès la naissance (Fenton et Rosenberg, 1995).

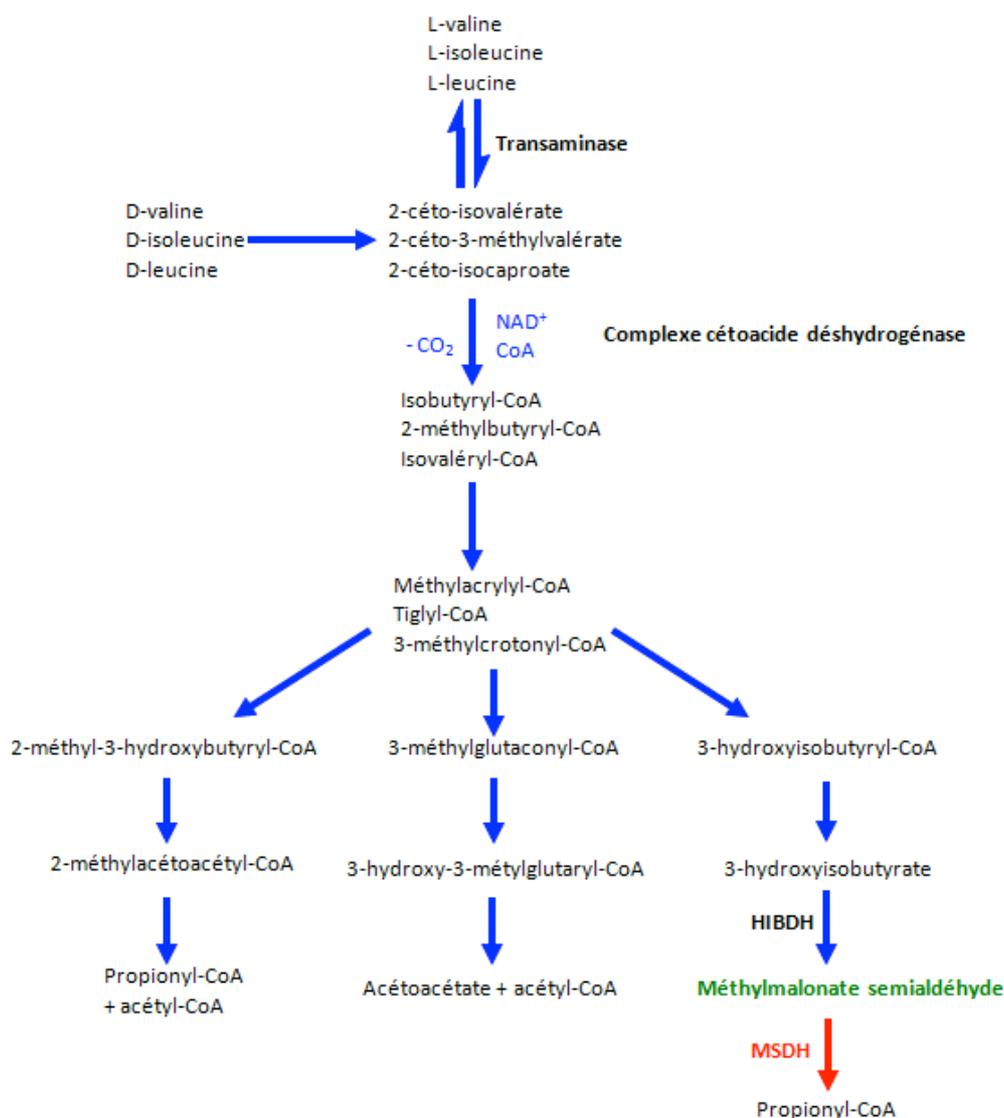


Figure 7 : Catabolisme des acides aminés branchés chez les bactéries (d'après Massey *et al.*, 1976).
HIBDH : Hydroxyisobutyrate Déshydrogénase ; MSDH : Méthylmalonate semialdéhyde Déshydrogénase

Etude bibliographique

La dégradation oxydative des bases pyrimidiques conduit à la formation de β -alanine dont la transamination oxydative aboutit au MSA qui est également substrat de la MSDH. L'acétyl-CoA issu de cette réaction sera utilisé dans le cycle de Krebs.

1.1.5 Le rétinaldéhyde (rétinal) et les rétinoïdes

Les rétinoïdes constituent une famille de lipides polyisoprénoïdes incluant le rétinol (ou vitamine A) et ses dérivés comme l'acide rétinoïque. Ces molécules sont indispensables chez les vertébrés car elles interviennent dans de nombreux processus biologiques comme la vision, l'embryogenèse, la reproduction, l'immunité, la croissance et la différenciation cellulaires. Plus précisément, le rétinol joue le rôle de chromophore dans le cycle visuel des vertébrés, d'intermédiaire central dans le métabolisme des rétinoïdes qui conduit en particulier à la synthèse d'acide rétinoïque (AR), et a récemment été impliqué directement dans la régulation de l'adipogenèse (Ziouzenkova *et al.*, 2007).

Au niveau de la vision, ce sont les propriétés optiques des isomères *tout-trans* et *11-cis* du rétinol qui sont mises à profit (Duester, 2000). En effet, au niveau de la rétine, la transduction du signal lumineux en signal nerveux est assurée par les pigments visuels, rhodopsine et iodopsines, présents dans les cellules spécialisées de la rétine, respectivement les photorécepteurs bâtonnets et cônes.

Rappelons que la rhodopsine est composée d'une protéine, l'opsine, liée par une base de Schiff au chromophore, le *11-cis* rétinol. Lorsque le *11-cis* rétinol absorbe un photon, il s'isomérisse en l'isomère *tout-trans* du rétinol, conduisant à des changements conformationnels de l'opsine pour générer le photoproduit actif, la métarhodopsine II, suite à l'hydrolyse spontanée de la liaison opsine-*tout-trans* rétinol. La métarhodopsine II induit une cascade de réactions impliquant une protéine G et aboutissant à la fermeture de canaux sodiques membranaires et à la génération d'un signal électrique transmis aux axones du nerf optique. Le rétinol *tout-trans* libéré permet la régénération du *11-cis* rétinol selon un processus appelé cycle visuel et impliquant plusieurs types d'enzymes décrites dans la figure 8 (Saari *et al.*, 2001).

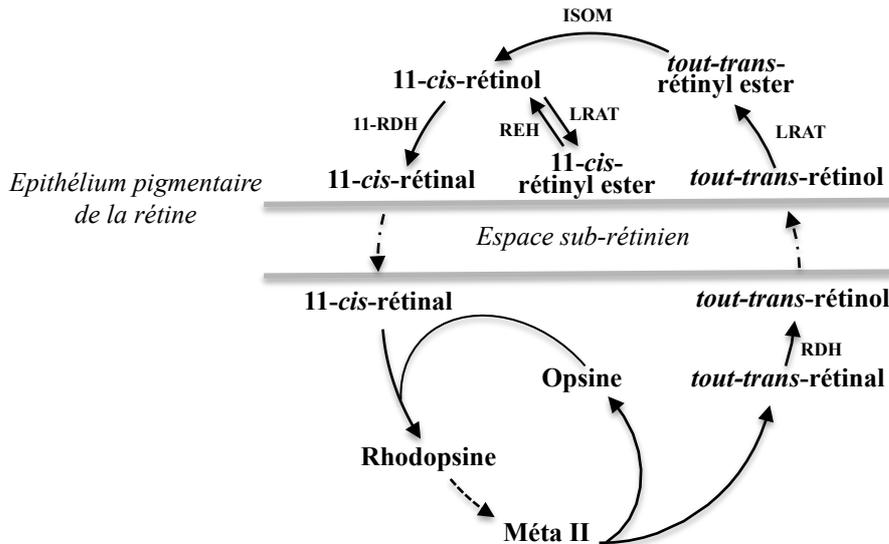


Figure 8 : Représentation schématique du cycle visuel (d'après Saari *et al.*, 2001).

Lorsque les molécules de rhodopsine absorbent un photon, le 11-*cis*-rétinal s'isomérisé en *tout-trans*-rétinal, qui induit des changements conformationnels de l'opsine pour générer la métarhodopsine II (Méta II). Le *tout-trans*-rétinal est réduit en *tout-trans*-rétinol par une rétinol déshydrogénase (RDH), localisée au niveau du segment externe du photorécepteur. Il est ensuite dirigé vers l'épithélium pigmentaire de la rétine où il est estérifié par la "lecithin-rétinol acyltransferase" (LRAT). Le *tout-trans*-rétinyl ester est ensuite converti en 11-*cis*-rétinol par une isomérohydrolase (ISOM), et peut être estérifié par la LRAT et stocké ou oxydé en 11-*cis*-rétinol par la 11-*cis*-rétinol déshydrogénase (11-RDH). Le 11-*cis*-rétinol diffuse s'associe à l'opsine pour régénérer le pigment visuel. Enfin le 11-*cis*-rétinyl ester peut être hydrolysé et utilisé pour régénérer le pigment visuel par la rétinyl-ester hydrolase (REH).

L'isomère *tout-trans* de l'AR constitue le métabolite majeur de la vitamine A et du rétinol, en tant que facteur cellulaire diffusible impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes cibles (Duester, 2000). Les effets de l'AR dépendent de sa fixation à des protéines de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RAR (« retinoic acid receptor ») et les RXR (« retinoic X receptor »). Ces récepteurs agissent en particulier sous forme d'hétérodimère RAR/RXR qui se fixent au niveau de séquences spécifiques (RARE pour Retinoïc Acid Response Element) situées dans les régions promotrices de gènes cibles (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004). En l'absence de ligand rétinol, ces récepteurs sont complexés à des molécules corépresseurs et jouent le rôle de répresseurs transcriptionnels. La liaison de l'AR déstabilise l'interaction avec les corépresseurs et favorise celle avec des coactivateurs, induisant ainsi un effet d'activation transcriptionnelle (Gronemeyer et Miturski, 2001 ; figure 9).

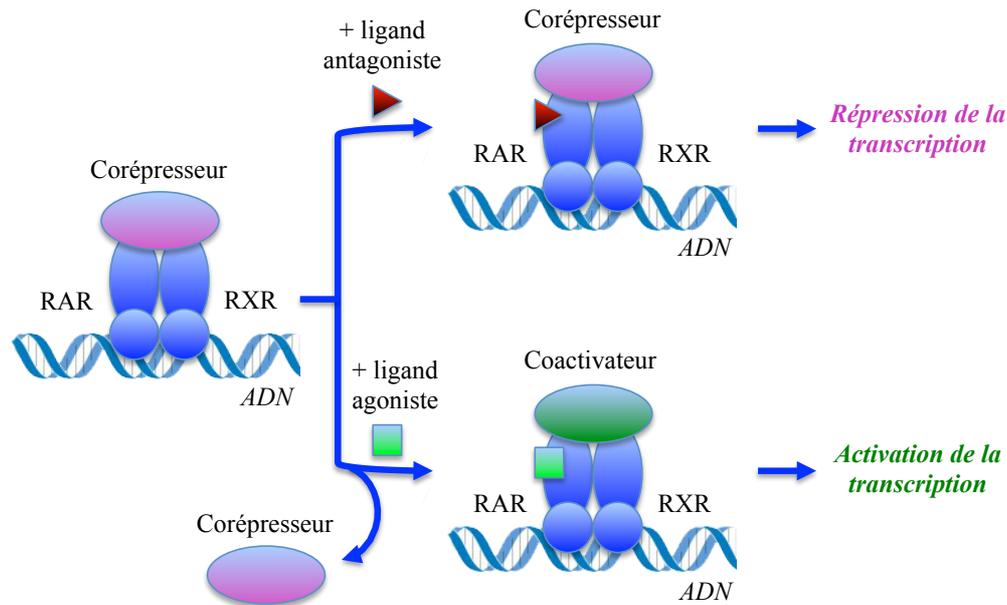


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'acide rétinoïque (AR) (adapté de Gronemeyer et Miturski, 2001).
RAR : « retinoic acid receptor » ; RXR : « retinoid X receptor »

Ce mode d'action est responsable des effets de l'AR dans de nombreux processus biologiques, en particulier au cours de l'embryogenèse, où l'AR agit en tant que signal paracrine qui transmet les informations spatiales déterminant la morphogenèse et l'organogenèse (Napoli, 1999 ; Maly *et al.*, 2003). Chez l'adulte, l'AR contrôle la différenciation des cellules épithéliales lors du processus de renouvellement cellulaire. Il joue donc un rôle préventif vis-à-vis des processus de carcinogenèse (Duester *et al.*, 2003). Ainsi, le potentiel thérapeutique de l'AR est avéré dans le traitement de certaines maladies comme l'acné, de pathologies affectant l'appareil visuel, ainsi que dans le traitement et la prévention de certains cancers comme, entre autres, la leucémie promyélocytaire aiguë (Altucci et Gronemeyer, 2001 ; Niles, 2004). Cependant, le développement de ces traitements est limité, en raison de la toxicité élevée de l'AR liée à ses effets tératogènes, muco-cutanés, hypertriglycéridémiant, et pouvant conduire à un syndrome de toxicité aiguë (Larson et Tallman, 2003 ; Parisotto *et al.*, 2006). *In vivo*, les précurseurs des rétinoïdes actifs provenant de l'alimentation, sont absorbés dans l'intestin sous forme de rétinol ou de β -carotène, puis stockés dans les cellules hépatiques sous forme d'esters de rétinyle.

L'AR est synthétisé dans les cellules cibles par un processus régulé consistant en deux étapes successives d'oxydation enzymatique à partir du rétinol, et impliquant également l'interaction avec des protéines de transport (figure 10), où le rétinol joue le rôle de métabolite

intermédiaire. L'oxydation réversible du rétinol en rétinol par une alcool déshydrogénase de la famille des ADH ou des SDR constitue l'étape limitante de la biosynthèse (Wang *et al.*, 2011). Le rétinol est ensuite oxydé de façon irréversible en AR par une rétinol déshydrogénase (RALDH) de la famille des ALDH (Duester *et al.*, 2003) (figure 10 et voir le § 2.1.2 p. 22).

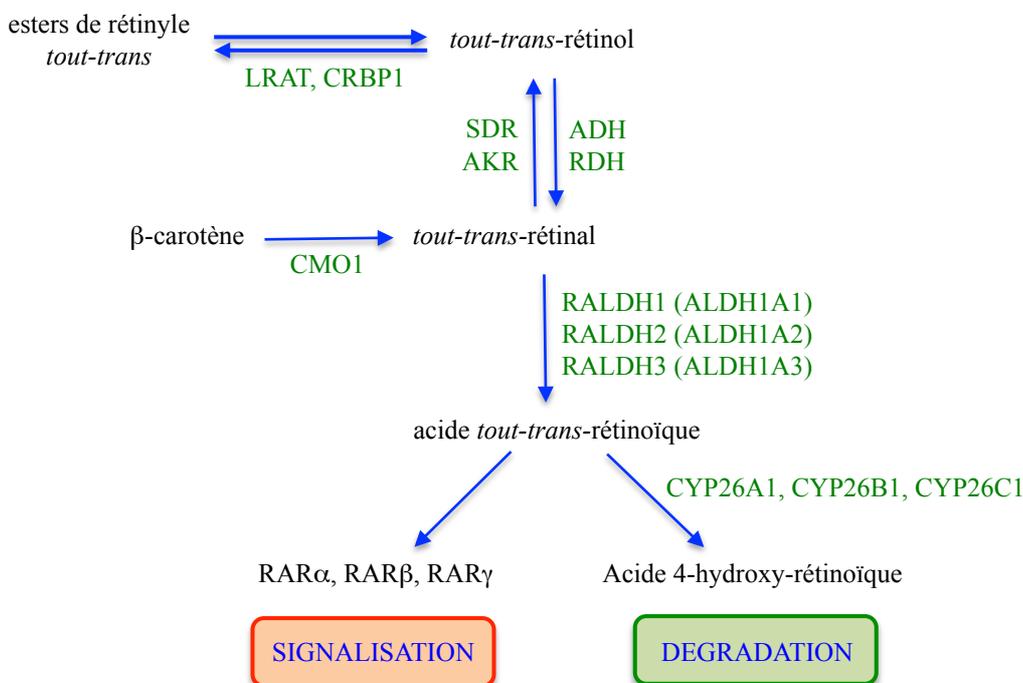


Figure 10 : Le métabolisme des rétinoïdes (d'après Kumar *et al.*, 2012).

Le *tout-trans*-rétinol (Vitamine A) peut être converti en esters de rétinol pour être stocké, par l'action de la lécithine-rétinol acyltransférase (LRAT) et en présence de la protéine CRBP1 (« cellular retinol-binding protein-1 »). De plus, le *tout-trans*-rétinol peut être oxydé en *tout-trans*-rétinal par l'alcool déshydrogénase (ADH) ou une rétinol déshydrogénase (RDH). Le *tout-trans*-rétinal peut également être généré par le clivage du bêta-carotène (provitamine A) par la caroténoïde-15, 15'-oxygénase (CMO1). Le *tout-trans*-rétinal peut être réduit en *tout-trans*-rétinol par les SDR ou par les aldo-cétoréductases (AKR). Le *tout-trans*-rétinal peut encore être oxydé en acide *tout-trans*-rétinoïque (AR) par les rétinol déshydrogénases (RALDH1, RALDH2, et RALDH3). L'AR peut également être oxydé en acide 4-hydroxy-rétinoïque par les cytochromes P450 (CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1).

1.2 Effets toxiques

1.2.1. Les aldéhydes comme polluants environnementaux

Bien que très largement utilisé dans l'industrie et au niveau médical comme désinfectant, le formaldéhyde (FA) est un polluant environnemental très répandu, retrouvé dans la fumée de cigarettes, les gaz d'échappements, les résines industrielles, et les dérivés du bois (agglomérés...). *In vivo*, il résulte également de la désalkylation de nitrosamines catalysée par les cytochromes P450 (CYP450), de l'hydrolyse de l'aspartame et de l'oxydation

Etude bibliographique

du méthanol. Au niveau cellulaire, le FA est un composé extrêmement réactif qui réagit avec les fonctions amines et amides pour former des ponts méthylènes conduisant à des adduits covalents avec les protéines et l'ADN. Il peut également conduire à la diminution de la concentration en glutathion réduit (Saito *et al.*, 2005 ; Teng *et al.*, 2001).

Certaines études ont mis en évidence le lien entre une exposition chronique au FA et les conséquences pathologiques en termes de cancers, d'effets tératogènes et de maladies neurodégénératives et vasculaires (Ma et Harris, 1988 ; Kilburn, 1994 ; Gulec *et al.*, 2006). Cependant la toxicité du FA a été largement sous-estimée parce qu'il est rapidement métabolisé et éliminé de l'organisme. Il peut être réduit en méthanol par l'ADH1 ou oxydé en formate par l'ALDH2 mitochondriale ou la formaldéhyde déshydrogénase glutathion-dépendante cytosolique (ADH3) (figure 11).

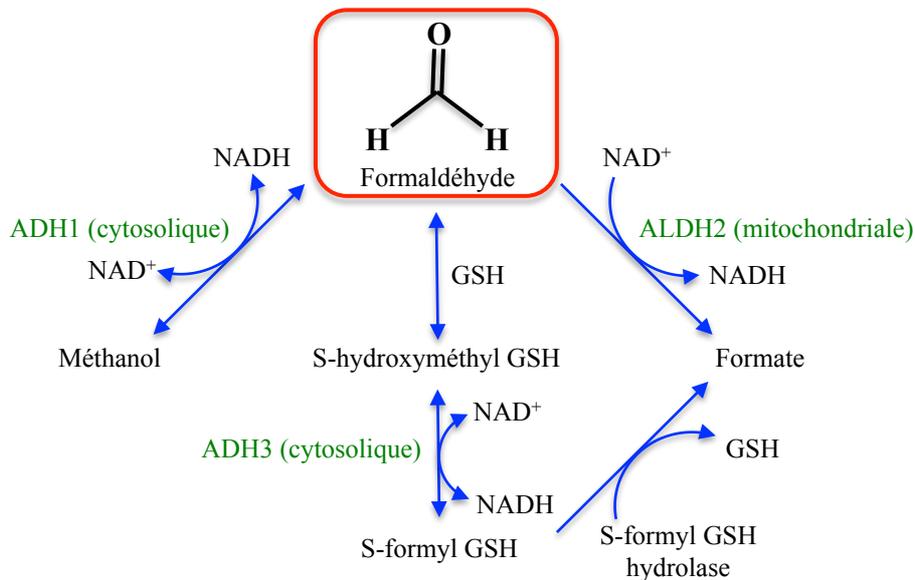


Figure 11 : Le métabolisme du formaldéhyde (adapté de Teng *et al.*, 2001).

ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; GSH : glutathion

L'acroléine, un aldéhyde α,β -insaturé très toxique car extrêmement réactif vis-à-vis des centres nucléophiles des biomolécules, constitue également un polluant atmosphérique majeur (rejets industriels, fumée de cigarette, gaz d'échappement,...) (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995 ; Burcham *et al.*, 2010) dont l'inhalation peut entraîner des pathologies respiratoires sévères. Elle est également présente dans l'organisme en tant que métabolite d'amines biogéniques telles que la spermine et la spermidine, ou encore résulte de la biotransformation hépatique de médicaments anticancéreux comme le cyclophosphamide

(Ludeman, 1999). Cependant, la peroxydation des lipides est à l'origine de la majeure partie des acroléines endogènes (voir paragraphe suivant) qui peuvent conduire à la destruction des membranes neuronales, des mitochondries ou encore des gaines de myéline (Shi *et al.*, 2011) (figure 12).

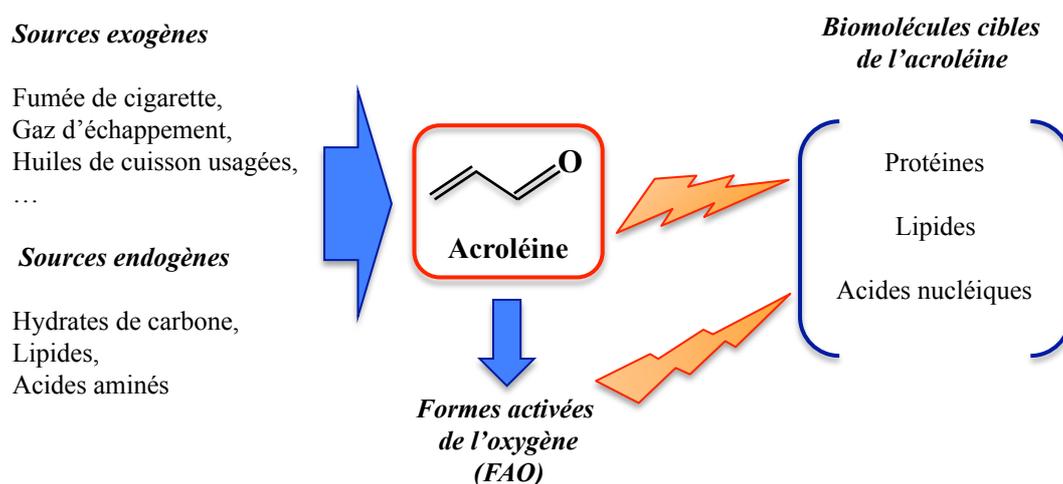


Figure 12 : La toxicité potentielle de l'acroléine (d'après Shi *et al.*, 2011).

1.2.2. Les aldéhydes générés par la peroxydation des lipides

Les aldéhydes dérivés de lipides (LDA) sont issus de la dégradation d'hydroperoxydes lipidiques résultant d'une réaction en chaîne non enzymatique, la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Ce processus biologique est associé au cycle cellulaire et au phénomène de vieillissement, consécutif à l'exposition à différents stress comme l'alcool, l'exposition aux UV, aux radicaux libres, et l'augmentation intracellulaire de composés chlorés ou iodés. Parmi les LDA, les plus abondants sont l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Le HNE, issu de la peroxydation de l'acide arachidonique et ses dérivés sont aujourd'hui bien connus et utilisés en médecine comme marqueurs pour évaluer l'état de stress oxydant chez des patients atteints de maladies neurodégénératives (Poli *et al.*, 2008). Le MDA peut quant à lui être généré par voie enzymatique à partir de prostaglandines. Ces composés sont plus stables que les radicaux libres, peuvent diffuser à travers les membranes et donc modifier des cibles éloignées du site initial de production. Par exemple, le MDA peut ponter les fibres de collagène amenant à une rigidité des tissus (Del Rio *et al.*, 2005). D'autre part, la peroxydation des lipides induit *via* les LDA, des perturbations de la microarchitecture, une

Etude bibliographique

altération de l'intégrité, de la fluidité et de la perméabilité membranaire, qui sont associées à de nombreuses pathologies comme certains cancers, le diabète, des irritations du système respiratoire, des maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer et de Parkinson ainsi que l'athérosclérose (Yin *et al.*, 2011). En effet, la formation d'adduits HNE-LDL (« Low density lipoprotein ») génère des formes proathérogéniques et proinflammatoires (Greenberg *et al.*, 2008).

Par contre, les LDA possèdent une dualité d'action qui peut, à faible concentration, conduire à des effets bénéfiques. En effet le HNE peut jouer un rôle régulateur de l'expression de gènes et activer des voies de signalisation induisant des mécanismes de survie en réponse à un stress cytotoxique (Niki, 2011).

Une enzyme cruciale pour la détoxification des LDA est la « fatty » ALDH (FALDH ou ALDH3A2). Une dérégulation de cette enzyme est rencontrée dans des pathologies comme les états hyper-insulinémiques ou les diabètes de type I en raison d'une aggravation des conséquences de la peroxydation lipidique. Une déficience en ALDH3A2 est responsable du syndrome de Sjörgren-Larson, une maladie génétique sévère caractérisée par des symptômes neuro-cutanés incluant un retard mental, une déficience respiratoire et des ichtyoses (Demozay *et al.*, 2004).

1.2.3. Lien entre alcoolisme et toxicité cellulaire

Des études épidémiologiques ont montré que la consommation chronique d'alcool constitue un facteur de risque important de développement de cancers notamment au niveau de la partie supérieure de l'appareil digestif (cavité buccale, pharynx, larynx et oesophage) et un facteur étiologique majeur de l'hépatocarcinogénèse (Yu *et al.*, 2010). Cette toxicité élevée serait principalement la conséquence de son oxydation en acétaldéhyde. L'éthanol est principalement métabolisé au niveau du foie par une série de réactions oxydatives catalysées par divers systèmes enzymatiques: l'alcool déshydrogénase (ADH), l'aldéhyde déshydrogénase 2 (ALDH2), le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et la catalase (figure 13 p. 17). Lors d'une consommation modérée ou occasionnelle, il est dans un premier temps oxydé en acétaldéhyde par l'ADH de classe 1 dans le cytosol des hépatocytes. Chez des consommateurs chroniques, une seconde voie est induite : le système microsomal d'oxydation de l'éthanol, également appelé voie MEOS. Dans ce cas, le CYP2E1 va catalyser son oxydation en acétaldéhyde en présence de NADPH et d'O₂. Enfin, une troisième voie d'oxydation de l'éthanol fait intervenir la catalase, localisée au niveau des peroxysomes, qui va catalyser la formation d'acétaldéhyde

en présence d' H_2O_2 . L'acétaldéhyde ainsi produit est alors oxydé de façon irréversible en acétate par l'ALDH2 au niveau des mitochondries. Cette réaction est très efficace car l'acétaldéhyde étant extrêmement toxique, il doit être métabolisé très rapidement après sa formation (voir paragraphe suivant). Enfin, la forme activée de l'acétate, l'acétylCoA, pourra être utilisée pour former des composés cétoniques (appelés « ketone bodies »), des acides aminés, des acides gras et des stéroïdes ou être oxydée dans le cycle de Krebs.

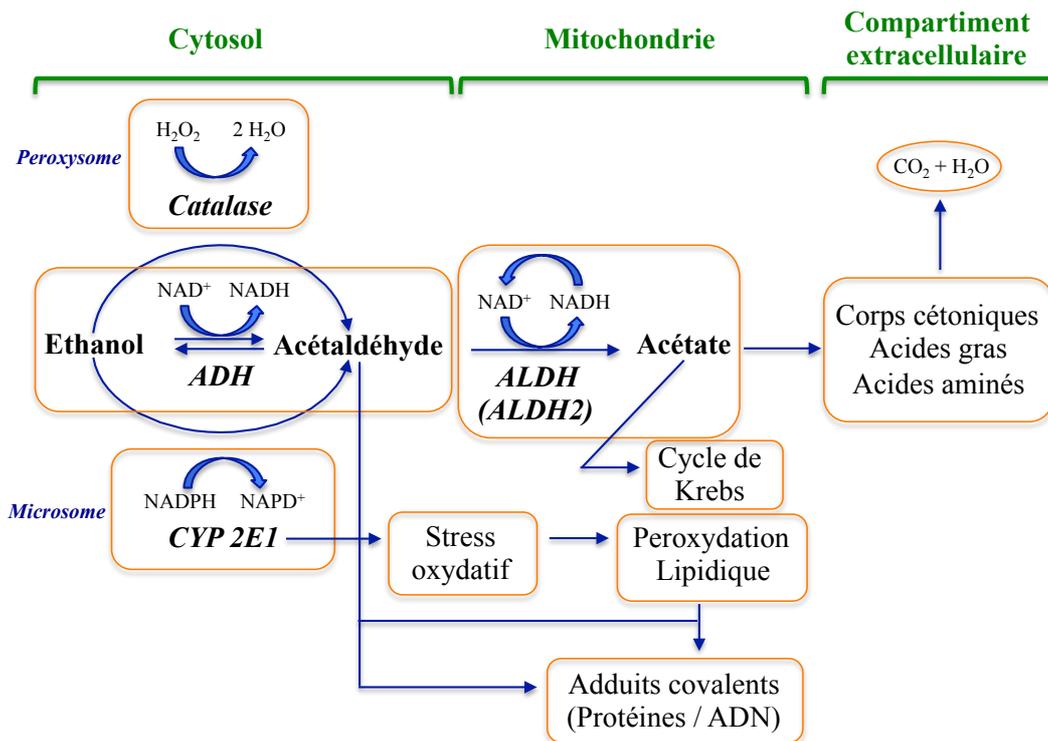


Figure 13 : Le métabolisme de l'éthanol (d'après Zhang et Ren, 2011).

L'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH), cytosolique, le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), microsomale, et la catalase, peroxysomale. L'acétaldéhyde est métabolisé principalement par l'aldéhyde déshydrogénase 2 (ALDH2) dans les mitochondries en acétate et de $NADH$.

Les effets toxiques engendrés par une consommation excessive d'alcool sont en fait multiples. Le fait que l'ADH1 et l'ALDH2 utilisent le NAD^+ comme cofacteur a comme conséquence une augmentation du rapport $NADH/NAD^+$. Cette modification de l'état redox des cellules est responsable de nombreux dysfonctionnements au niveau de voies métaboliques essentielles impliquant des déshydrogénases comme le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras. Dans ce cas, l'absence d'apport énergétique et d'oxydation des acides gras conduit à l'apparition d'une stéatose ou foie gras alcoolique (Purohit *et al.*, 2009). D'autre part l'induction de la voie MEOS conduit à l'activation du CYP2E1. Il en résulte une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène qui vont notamment favoriser la formation de LDA (voir § 1.2.2 p. 15 et figure 14). Enfin, la saturation des

Etude bibliographique

systèmes de détoxification, en particulier l'ALDH2, conduit à une accumulation de l'acétaldéhyde. Etant très réactif, celui-ci va alors former des adduits covalents, avec les protéines et l'ADN, à l'origine du développement de pathologies cardiovasculaires, hépatiques, de maladies neurodégénératives et de cancers (Setshedi *et al.*, 2010). Parmi les adduits formés avec l'ADN, la 1,N(2)-propano-2'- désoxyguanosine se distingue par ses effets génotoxiques et mutagènes ainsi que par sa capacité à induire des lésions secondaires conduisant à la mort cellulaire.

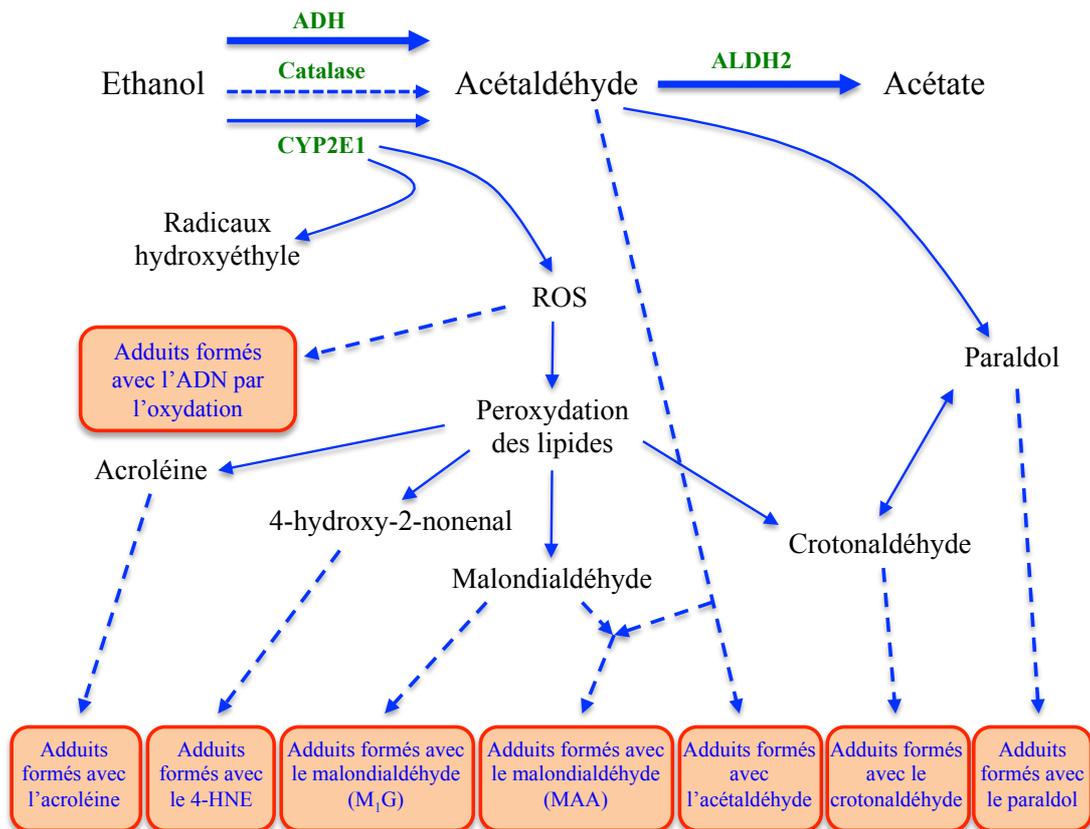


Figure 14 : Représentation schématique de la formation d'adduits dans la voie métabolique de l'éthanol (d'après Yu *et al.*, 2010).

Les adduits d'acroléine et du 4-HNE sont formés par la réaction de l'ADN avec l'acroléine et le 4-HNE, des produits majeurs de la peroxydation des lipides dans la cellule. Le M₁G (pyrimido-[1,2-a]-purin-10(3H)-one) est un produit formé par la réaction de l'ADN avec le MDA, également un produit de la peroxydation des lipides. Le MAA (malondialdéhyde-acétaldéhyde) est formé par la réaction des protéines avec le MDA et l'acétaldéhyde. Les adduits du crotonaldéhyde et du paraldol sont formés respectivement entre le crotonaldéhyde et du paraldol avec l'ADN.

De même, la formation d'adduits avec la O₆ méthylguanine transférase altère des mécanismes de réparation de l'ADN ce qui pourrait favoriser des processus de carcinogénèse. Au niveau cérébral, l'acétaldéhyde serait également impliqué dans le processus de dépendance à l'alcool en formant le salsolinol après réaction avec la dopamine.

2. Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)⁺

Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)⁺ forment une vaste famille d'enzymes ubiquitaires catalysant l'oxydation d'un spectre très étendu d'aldéhydes en acides activés ou non. Jusqu'en 2003, deux familles d'ALDH structurellement et phylogénétiquement distinctes étaient caractérisées : les ALDH phosphorylantes et les ALDH non phosphorylantes hydrolytiques ou CoenzymeA (CoA)-dépendantes (Habenicht *et al.*, 1994 ; Michels *et al.*, 1994). Cette description classique a été remise en cause par l'identification d'une troisième famille d'ALDH à partir de l'analyse de la structure cristalline d'une enzyme bifonctionnelle de *Pseudomonas* sp. CF600, la 4-hydroxy-2-cétovalérate aldolase/acétaldéhyde déshydrogénase (DmpFG). En effet, la sous-unité portant l'activité aldéhyde déshydrogénase non-phosphorylante CoA-dépendante est structurellement apparentée à la famille des ALDH phosphorylantes. Cette nouvelle famille, uniquement retrouvée chez certains genres bactériens, est donc un hybride des deux familles d'ALDH décrites jusqu'alors (Powlowski *et al.*, 1993 ; Manjasetty *et al.*, 2003).

Les ALDH ont en commun d'oxyder la fonction aldéhyde par un mécanisme à deux étapes, une étape d'acylation commune aux trois familles suivie d'une étape de désacylation qui diffère par la nature de l'accepteur d'acyle. L'étape d'acylation implique la formation d'un intermédiaire hémithioacétal par attaque nucléophile d'une cystéine essentielle du site actif sur la fonction aldéhyde, puis un processus d'oxydo-réduction à deux électrons qui conduit à la formation de l'intermédiaire thioacylenzyme et de NAD(P)H. Dans la famille des ALDH phosphorylantes, le phosphate inorganique joue le rôle d'accepteur d'acyle conduisant à la formation d'acides activés sous forme d'anhydride d'acides (Armstrong et Trentham, 1976). Par contre, dans le cas des ALDH non phosphorylantes, l'intermédiaire thioacylenzyme subit l'attaque nucléophile soit d'une molécule d'eau pour former un acide carboxylique, soit d'une molécule de CoA pour former un acide activé (figure 15). En cohérence avec mon projet de thèse, seuls les aspects mécanistiques et structuraux relatifs aux ALDH non phosphorylantes classiques seront détaillés par la suite.

Etude bibliographique

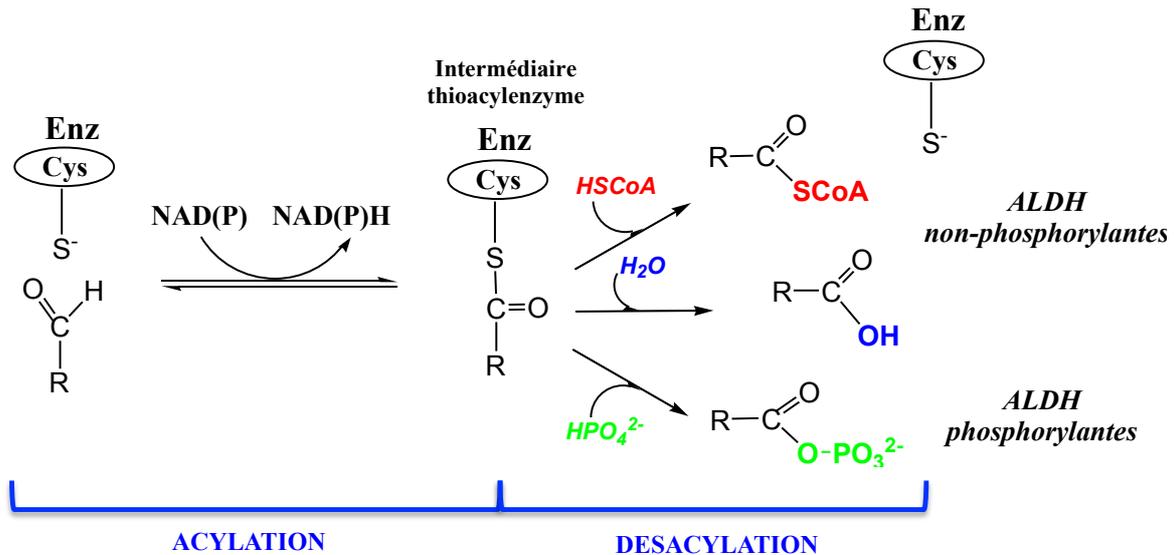


Figure 15 : Schéma simplifié des réactions catalysées par les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P). Enz = enzyme

Avant de présenter l'importance des ALDH non phosphorylantes au niveau physiologique, il est nécessaire de détailler les nomenclatures utilisées pour leur classification. En effet, selon l'ancienne nomenclature, établie par Hempel et Lindahl en 1989, les ALDH de mammifères ont été classées en quatre classes principales. La classe 1 correspondait aux ALDH d'origine cytosolique (Eckfeldt et Yonetani, 1976), la classe 2 aux ALDH d'origine mitochondriale (Farres *et al.*, 1989), la classe 3 aux ALDH inducibles par les effets d'agents cytotoxiques et enfin la classe 4 aux ALDH d'origine microsomale (Miyachi *et al.*, 1991). Cette nomenclature est encore utilisée, par exemple, pour l'enzyme sur laquelle ont travaillé T.D. Hurley et H. Weiner, l'ALDH2. Mais une nouvelle classification a été proposée par Vasiliou et son équipe (<http://www.aldh.org>). Les ALDH sont classées en fonction de leur taux d'identité de séquence. Si deux ALDH ont plus de 40% d'identité, elles seront regroupées dans la même famille. Avec un taux d'identité de séquence de 60% minimum, elles appartiendront à une même sous-famille. Chaque enzyme est désignée par le préfixe ALDH suivi d'un chiffre arabe pour la famille, une lettre pour la sous-famille et un chiffre arabe pour le gène. Initialement, cette nomenclature avait été mise en place pour les ALDH eucaryotes, puis a été étendue aux ALDH bactériennes et d'*archae*. A ce jour, 19 classes d'ALDH ont été identifiées chez l'homme.

2.1 Rôles physiologiques

Parmi les familles d'enzymes capables de métaboliser les aldéhydes, les ALDH non phosphorylantes jouent un rôle essentiel dans la protection cellulaire contre les aldéhydes toxiques, comme le révèle le lien direct existant entre certaines mutations et polymorphismes identifiés chez certaines familles d'ALDH (conduisant à une diminution ou perte d'activité) et plusieurs maladies et désordres métaboliques chez l'homme. C'est le cas par exemple du syndrome de Sjörger-Larsson, de l'hyperprolinémie de type II, de l'acidurie γ -hydroxybutyrique, de l'épilepsie pyridoxino-dépendante, de l'hyperammonémie, de maladies associées à l'alcool, de cancers, et de la maladie d'Alzheimer dans sa phase tardive (Marchitti *et al.*, 2008, pour revue). En outre, certaines ALDH sont également impliquées de façon critique dans d'autres fonctions physiologiques, dont trois exemples sont développés ci-dessous en lien avec mon travail de recherche.

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

La GAPN catalyse l'oxydation du G3P en 3-phosphoglycérate (3PG). Dans la plupart des cas, c'est une enzyme strictement NADP dépendante.

Chez les organismes photosynthétiques, cette enzyme intervient dans le transfert d'équivalents réducteurs du chloroplaste vers le cytoplasme lors de la photosynthèse. Le cofacteur NADPH ainsi produit par l'oxydation du G3P est utilisé pour des réactions biosynthétiques (Kelly et Gibbs, 1973).

Concernant les organismes non photosynthétiques, la GAPN est également présente pour produire le NADPH nécessaire au métabolisme cellulaire. De plus, des études ont montré que la complémentation par la *gapn* d'une souche d'*E. coli* délétée du gène des GAPDH permet de restaurer une croissance aérobie sur un milieu enrichi en oses, mais la fermentation anaérobie en présence d'oses ou la croissance aérobie sur substrat gluconéogénique reste impossible. Ainsi la GAPN permet de contourner la voie phosphorylante du catabolisme du glucose, en impliquant une voie glycolytique sans rendement énergétique net (Valverde *et al.*, 1999).

2.1.2. Rôles physiologiques des rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH)

Les RALDH catalysent l'oxydation des isomères *tout-trans* ou *9-cis* du rétinol en AR. Les RALDH décrites à ce jour sont au nombre de trois : la RALDH1 (ALDH1A1), la RALDH2 (ALDH1A2) et la RALDH3 (ALDH1A3). Une quatrième enzyme spécifique du *9-cis* rétinol a été identifiée dans le foie et les reins, la RALDH4 (ALDH8A1) (Lin *et al.*, 2003). Elle est cependant divergente des trois premières, avec au maximum 50% d'identité de séquence et sa contribution réelle au métabolisme des rétinoïdes a été encore peu étudiée. Les RALDH présentent des spécificités de substrat et des répartitions spatiotemporelles spécifiques.

La RALDH1 convertit les isomères *tout-trans* ou *9-cis* du rétinol en leur acide rétinoïque correspondant (Lin *et al.*, 2003). Son expression a été détectée au niveau embryonnaire dans la partie dorsale de la rétine et à l'âge adulte dans les épithéliums de divers organes comme les testicules, le cerveau, la rétine, et dans le foie (Ginestier *et al.*, 2007). Chez la souris, l'inactivation du gène codant la RALDH1 conduit à un phénotype relativement léger, les animaux présentant un taux de survie normal à l'âge adulte, qui suggère la compensation de la production d'AR par les autres RALDH. En revanche, la RALDH1 semblerait impliquée dans l'homéostasie de la vitamine A au niveau du foie suite à son absorption en excès.

La RALDH2 oxyde le *tout-trans* rétinol en acide *tout-trans* rétinoïque avec une efficacité supérieure à la RALDH1 (Duester, 2000). La RALDH2 est responsable de la biosynthèse précoce d'AR au cours du développement embryonnaire. L'inactivation du gène codant la RALDH2 conduit à un phénotype sévère, qui entraîne la mort de l'embryon à mi-gestation en raison de nombreuses malformations. La présence de la RALDH2 détermine notamment la formation de l'axe antéropostérieur, la morphogenèse des membres et de structures vitales comme le cœur, la colonne vertébrale, la région fronto-nasale, ... (Niederreither *et al.*, 2002). Dans un embryon sain, l'action coordonnée de la RALDH2, qui contribue à 80 % de la production d'AR, et de CYP26A1, appartenant à la famille des cytochromes P450 et qui est impliquée dans le catabolisme de l'AR, est responsable de la distribution spatiotemporelle de l'AR au cours du développement (Dobbs-McAuliffe *et al.*, 2004). Chez l'adulte, le rôle de la RALDH2 a été établi au cours de la spermatogenèse (Vernet *et al.*, 2006) et impliquée dans la suppression des tumeurs de la prostate (Kim *et al.*, 2005), dans la maturation des lymphocytes T ainsi que dans la régénération de tissus et d'organes chez le poisson zèbre (Gudas, 2012) et la réparation de lésions du système nerveux central (Mey, 2006).

En ce qui concerne la RALDH3, elle est impliquée de façon plus localisée dans la synthèse d'AR pendant le développement embryonnaire. En effet l'invalidation de son gène entraîne la mort du fœtus à la naissance en raison de malformations cranio-faciales entraînant une insuffisance respiratoire, bien que l'embryon reste sain dans son ensemble (Dupe *et al.*, 2003). Chez l'adulte, la RALDH3 est exprimée dans de nombreux tissus, notamment l'intestin, le foie, le pancréas et les poumons, sans que son rôle précis soit encore connu.

Au niveau des tissus oculaires, les RALDH sont très présentes dans la cornée et le cristallin, en particulier les RALDH1 et 3, qui jouent un rôle essentiel dans la défense contre les rayonnements UV et le stress oxydant qui en découle. En effet, de nombreux aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) sont générés sous l'effet d'un stress UV *via* la peroxydation des lipides (voir § 1.2.2. p. 15). Ainsi, la RALDH3, l'une des protéines les plus abondantes dans la cornée, joue un rôle de détoxication du HNE (Marchitti *et al.*, 2011). Cette enzyme est aussi impliquée dans la production du NAD(P)H nécessaire au recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit, important dans la lutte contre le stress oxydant. Une diminution de l'expression de la RALDH3 dans les tissus oculaires entraîne une augmentation de la concentration d'aldéhydes issus de la peroxydation des lipides, qui pourrait être associée à des pathologies comme la cataracte, le décollement rétinien ou encore des rétinopathies. Quant à la RALDH1, elle est également impliquée dans la réponse cellulaire à l'exposition aux rayonnements UV en agissant préférentiellement sur le MDA (Marchitti *et al.*, 2011).

2.1.3. ALDH CoA-dépendantes

La MSDH catalyse l'oxydation du méthylmalonate ou du malonate semialdéhyde respectivement en propionyl-CoA et acétyl-CoA. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des acides aminés tels que la valine (voir § 1.1.4. p. 9) chez les bactéries et les mammifères, où elle est très présente dans le foie. La MSDH intervient également dans le métabolisme des pyrimidines chez les mammifères tandis que chez la bactérie *B. subtilis*, elle catalyse l'oxydation du malonate semialdéhyde en acétyl-CoA, dans la voie du catabolisme du myo-inositol. Une possible corrélation entre des acidémies organiques et une déficience en MSDH a été proposée, associée à un retard de développement (Pollitt *et al.*, 1985 ; Gray *et al.*, 1987 ; Gibson *et al.*, 1993, Chambliss *et al.*, 2000). Très récemment, une étude de Sass *et al.*, (2012) a suggéré qu'un polymorphisme du gène *aldh6a1* codant la MSDH soit directement associé à l'acidurie 3-hydroxybutyrique, une maladie métabolique sévère.

Etude bibliographique

Les ALDH non phosphorylantes CoA-dépendantes peuvent également présenter des intérêts au niveau d'applications industrielles. En effet, des bactéries sont utilisées pour la production de solvants organiques tels que l'acétone, le butanol ou encore le propan-2-ol. Certaines d'entre elles utilisent des ALDH CoA-dépendantes dans les voies de biosynthèse de ces solvants. Par exemple, chez *Clostridium beijerinckii*, une ALDH acylante CoA-dépendante codée par le gène *ald* intervient dans la voie de production du butanol, en catalysant la transformation du butyryl-CoA en butyraldéhyde.

2.2. Structure

Actuellement, 146 structures cristallines d'ALDH sont répertoriées dans la "Protein Data Bank" mais une majorité d'entre elles correspond en fait à différents états (complexes, variants ...) de la même ALDH. A l'exception de la structure de la MSDH de *B. subtilis* et de celle d'une MSDH putative de *Sinorhizobium meliloti*, toutes les autres ont été déterminées pour des ALDH hydrolytiques. L'analyse de ces structures montre que les ALDH hydrolytiques sont majoritairement organisées en homotétramères structurés en dimères de dimères, ou dans certains cas en homodimères, et que les monomères adoptent un repliement similaire avec des chaînes principales quasiment superposables. Dans les paragraphes suivants, les différents aspects structuraux développés feront référence à la première structure cristalline d'ALDH tétramérique, à savoir l'ALDH2 bovine (Steinmetz *et al.*, 1997).

2.2.1. Structure du monomère

Chaque monomère est constitué de trois domaines. Le domaine de fixation du cofacteur et le domaine catalytique adoptent une forme non canonique du repliement $\beta/\alpha/\beta$ de Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974) avec 5 brins β au lieu de 6 et des éléments de structure secondaire additionnels. Le troisième domaine, appelé domaine d'oligomérisation est formé d'un feuillet β anti-parallèle à 3 brins.

2.2.1.1. Domaine et mode liaison du cofacteur

La partie centrale de ce domaine de liaison est caractéristique du site de fixation des cofacteurs nucléotidiques type NAD(P)^+ et se compose d'un feuillet β parallèle à cinq brins (β_7 à β_{11}) correspondant aux brins du repliement de Rossmann canonique, auxquels sont

associées les hélices α_D à α_G . Ce motif $\beta/\alpha/\beta$ est complété en amont par deux feuilletts β antiparallèles à deux brins (β_1/β_2 et β_3/β_4) et les hélices α_A à α_C , et en aval, par l'hélice α_N (figure 16). L'examen des premières structures cristallines de complexes binaires ALDH/NAD⁺ a permis de mettre en évidence un mode de liaison du cofacteur sensiblement différent de celui habituellement décrit pour les ALDH phosphorylantes comme la GAPDH et plus généralement les déshydrogénases à repliement de Rossmann (Liu *et al.*, 1997 ; Steinmetz *et al.*, 1997). De plus, la comparaison des structures cristallines obtenues pour l'ALDH2 bovine sous forme apo ou complexée au NAD⁺ a révélé que, contrairement à ce qui est observé pour les autres déshydrogénases, la liaison du cofacteur ne conduit à aucun changement conformationnel notable de la chaîne polypeptidique (Steinmetz *et al.*, 1997). Cette observation est d'ailleurs valable pour l'ensemble des structures d'ALDH pour lesquelles cette comparaison a pu être effectuée.

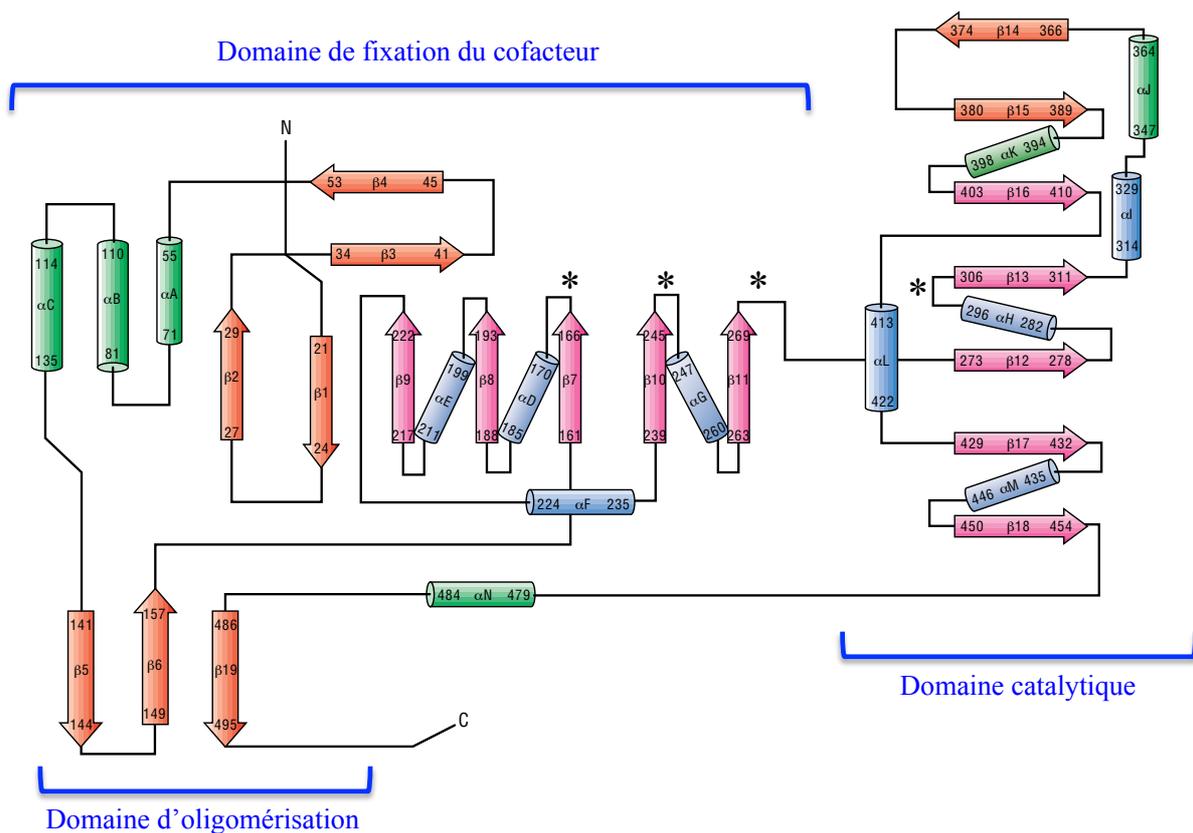


Figure 16 : Diagramme topologique du monomère de l'ALDH2 bovine (d'après Steinmetz *et al.*, 1997).

Les éléments de structure secondaire sont représentés par des flèches pour les brins β et par des cylindres pour les hélices α . Le domaine de fixation du cofacteur comprend les brins β_1 à β_4 , les brins β_7 à β_{11} , les hélices α_A à α_G , ainsi que l'hélice α_N . Le domaine catalytique comprend les brins β_{12} à β_{18} et les hélices α_H à α_M . Le domaine d'oligomérisation comprend les brins β_5 , β_6 et β_{19} . * : Positions des résidus participant au site actif.

Etude bibliographique

Le mode de liaison du NAD^+ est caractérisé par un nombre d'interactions plus faible résultant d'un positionnement différent de la partie adénosine monophosphate. Celui-ci aurait pour origine une modification de la conformation de la boucle β_7 - α_D , due à la présence de la Pro171 invariante, qui impose une exposition plus importante du cofacteur au solvant et surtout un mouvement de la partie adénosine monophosphate (Johansson *et al.*, 1998). La première conséquence est la localisation de la partie pyrophosphate à proximité de l'extrémité N-terminale de l'hélice α_G et non plus de l'hélice α_D comme observé dans les autres déshydrogénases. Chez ces dernières, la stabilisation des charges négatives de la partie pyrophosphate est assurée par la charge positive partielle présente à l'extrémité N-terminale de cette hélice. Cette interaction est favorisée par le faible encombrement stérique des résidus G_1 et G_2 du motif canonique $G_1XG_2XXG_3$, généralement retrouvé dans la boucle connectant β_7 et α_D (β_1 et α_A d'après la nomenclature définie pour le repliement de Rossmann). Dans les ALDH, ce motif est absent et bien qu'une signature proche (GstXXG) soit retrouvée à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_G , une interaction stabilisatrice charge-dipôle n'est pas possible puisque la partie pyrophosphate n'est pas positionnée dans l'axe de cette hélice. Par contre, elle est stabilisée par l'établissement de liaisons hydrogène entre d'une part, le phosphate adjacent à l'adénosine et la Ser246, résidu très conservé de la signature GstXXG, et d'autre part, le phosphate adjacent au nicotinamide et le résidu Trp168 (figure 17).

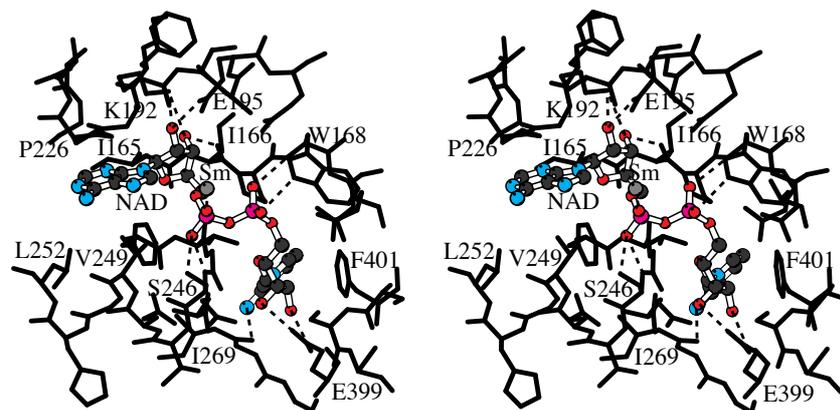


Figure 17 : Représentation stéréo des interactions entre le NAD^+ et l'ALDH2 bovine (d'après Steinmetz *et al.*, 1997).

La molécule de NAD est représentée selon le modèle « ball-and-stick » et la couleur de chaque atome correspond au type d'atome. Les liaisons hydrogène potentielles sont représentées sous forme de tirets.

La majorité des contacts implique la partie adénosine du cofacteur. Le cycle de l'adénine, positionné entre les hélices α_F et α_G , établit des contacts de van der Waals avec les

résidus Gly225, Pro226, Val229 et Leu252. Le ribose adjacent est quant à lui stabilisé par l'établissement de liaisons hydrogène entre la chaîne latérale du résidu invariant Lys192 et ses groupements 2'OH et 3'OH. Ces derniers sont également impliqués dans des liaisons H avec respectivement la chaîne latérale du résidu Glu195 et la fonction carbonyle du résidu Ile166 (figure 17).

Dans la quasi-totalité des structures disponibles, la partie nicotinamide mononucléotide (NMN) est beaucoup moins stabilisée, ce qui se caractérise par une densité électronique faible voire absente. Les seules exceptions sont la η -cristalline (code PDB 1o9j) et l'ALDH1L1 (code PDB 2o2q). Cependant, la η -cristalline est une ALDH inactive qui agit comme filtre anti-UV au niveau du cristallin, alors que pour l'ALDH1L1 la stabilisation de la partie NMN est principalement assurée par la formation d'un adduit covalent entre le C4 du cycle nicotinamide et la Cys catalytique. Dans la structure de l'ALDH2, le positionnement du ribose adjacent au nicotinamide est assuré par des liaisons hydrogène impliquant les fonctions hydroxyle en position 2' et 3' et la fonction carboxylate de la chaîne latérale du résidu invariant Glu399, et par des contacts de van der Waals avec la chaîne latérale du résidu invariant Phe401. Le cycle nicotinamide établit des contacts de van der Waals avec les chaînes latérales des résidus invariants Asn169, Thr244 et Cys302, alors que l'atome d'azote de la fonction carboxamide établit une liaison hydrogène avec la fonction carbonyle du résidu Ile269 (figure 17). Ce mode de stabilisation sera discuté plus en détails dans le paragraphe 2.3.3.2. p. 36.

2.2.1.2. Domaine catalytique

Comme indiqué précédemment, le domaine catalytique adopte également un repliement de type $\beta/\alpha/\beta$ composé d'un feuillet β parallèle à cinq brins (β_{12} , β_{13} , β_{16} , β_{17} et β_{18}) auquel s'ajoutent un feuillet β antiparallèle à deux brins (β_{14} et β_{15}) et les hélices α_K et α_J . Le site actif est localisé à la base d'un tunnel hydrophobe de 12 Å alors que le site de liaison du substrat est situé à proximité de l'interface du tétramère et à l'opposé du site de liaison du cofacteur. Le cycle nicotinamide divise la base de ce tunnel en deux parties dénommées face A et face B en référence à la stéréospécificité de transfert d'hydrure au niveau du carbone 4 du cycle (respectivement pro-R et pro-S). Au niveau de la face A est retrouvée la Cys302 catalytique (plus les Cys301 et 303 non invariantes) et au niveau de la face B sont présents les résidus invariants Thr244 et Glu268 ainsi que le résidu Glu476. Les résidus Asn169, Glu268

Etude bibliographique

et Cys302 catalytiques sont localisés respectivement dans la boucle β_7 - α_D , à l'extrémité du brin β_{11} (ces deux éléments de structure secondaire appartenant au domaine de liaison du cofacteur) et dans la boucle α_H - β_{13} (figure 16 p. 25).

2.2.2. Organisation quaternaire

Les ALDH tétramériques sont structurées en dimère de dimères. La formation de chaque dimère implique des contacts entre les hélices α_G de deux sous-unités adjacentes alors que des résidus du brin β_{18} d'une sous-unité interagissent avec des résidus appartenant au brin β_{19} de l'autre sous-unité. Il en résulte la formation d'un feuillet β à dix brins qui s'étend du domaine catalytique au domaine d'oligomérisation. La cohésion du tétramère est ensuite assurée par des interactions entre les brins β_5 de chaque dimère conduisant à la formation d'un feuillet β antiparallèle à vingt brins (figure 18).

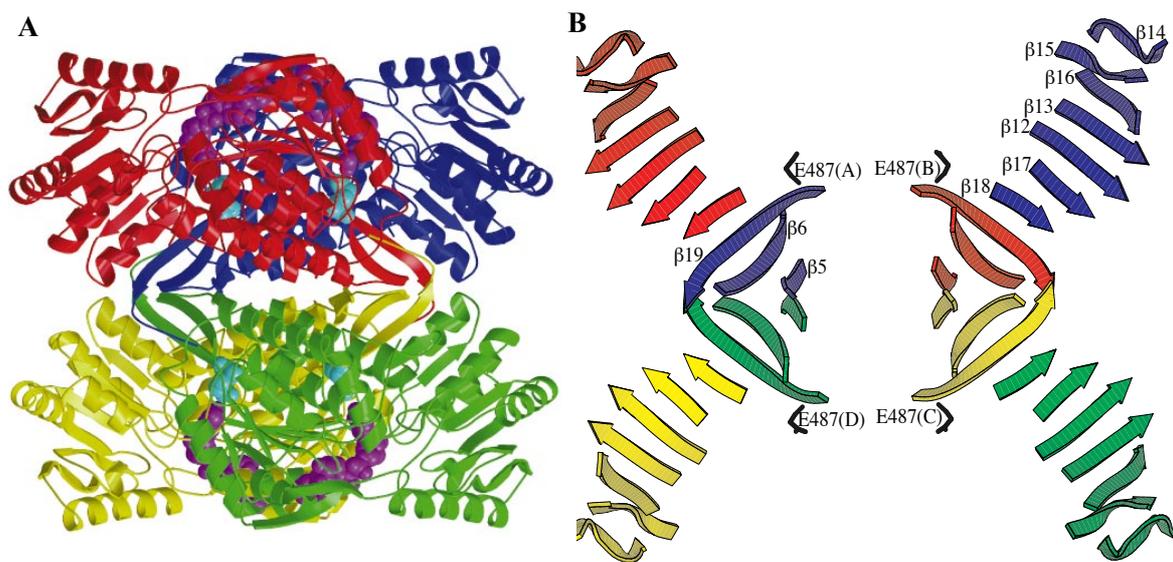


Figure 18 : Organisation quaternaire adoptée par les ALDH tétramériques (d'après Steinmetz *et al.*, 1997).

A. Représentation schématique de la structure du tétramère de l'ALDH2 bovine sous forme holoenzyme. Seule la chaîne principale est représentée sur cette figure. Le NAD^+ et le Glu487 sont représentés respectivement en violet et cyan.

B. Représentation schématique des interfaces intra- et inter-dimères du tétramère de l'ALDH2 bovine. Seuls les brins β appartenant aux domaines catalytiques et d'oligomérisation sont représentés. Il est à noter que le domaine d'oligomérisation de chaque monomère est impliqué dans des contacts intra- et inter-dimères.

2.3. Mécanismes réactionnels

2.3.1. Mécanismes cinétiques

Les ALDH hydrolytiques catalysent l'oxydation irréversible d'un aldéhyde en acide carboxylique. Le caractère irréversible de cette réaction est la conséquence de la déprotonation de la fonction acide en solution. Au niveau cinétique, toutes les études réalisées sur ces ALDH sont en faveur d'un mécanisme séquentiel ordonné (Bradbury et Jakoby, 1971 ; Eckfeldt et Yonetani, 1976 ; MacGibbon *et al.*, 1977 ; Bostian et Betts, 1978 ; Vallari et Pietruszko, 1981 ; Trost et Pupillo, 1993 ; Marchal *et al.*, 2000) (figure 19 A). Dans un tel mécanisme, la liaison du cofacteur précède celle du substrat et, après les différentes étapes de la catalyse, la libération des produits correspondants suit un ordre inverse. La libération du cofacteur réduit peut donc être qualifiée de « tardive ». A l'inverse, les données disponibles pour les ALDH CoA-dépendantes sont compatibles avec un mécanisme cinétique de type ping-pong au cours duquel la dissociation du cofacteur réduit précède la liaison du CoA (Shone et Fromm, 1981 ; Sohling et Gottschalk, 1993 ; Stines-Chaumeil *et al.*, 2006) (figure 19 B). Dans ce cas, l'étape de dissociation du cofacteur peut donc être qualifiée de « précoce ».

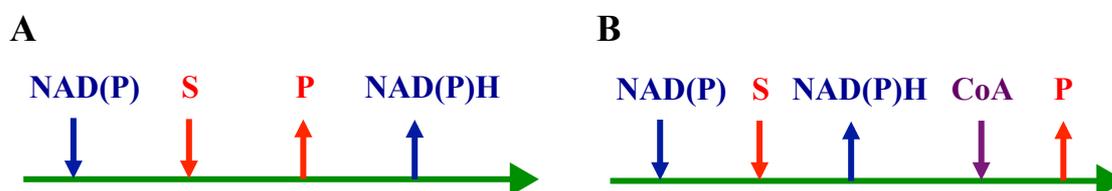


Figure 19 : Schémas des mécanismes cinétiques selon la représentation de Cleland.

A. Mécanisme cinétique dans les ALDH hydrolytiques. Dans cette famille, les études sont en faveur d'un mécanisme séquentiel ordonné, avec dissociation tardive du cofacteur réduit.

B. Mécanisme cinétique dans les ALDH CoA-dépendantes. Dans cette famille, le mécanisme est de type ping-pong, avec dissociation précoce du cofacteur réduit.

S : Substrat ; P : Produit

2.3.2. Mécanismes catalytiques

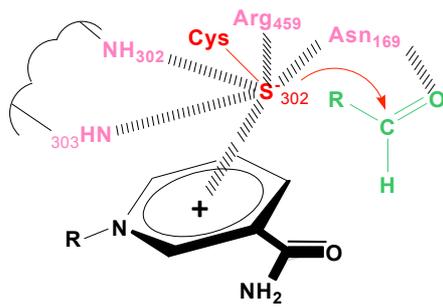
2.3.2.1. ALDH hydrolytiques

Bien que d'autres équipes aient mis en évidence le rôle essentiel des résidus invariants Cys302 et Glu268 dans la catalyse (Farres *et al.*, 1995 ; Vedadi *et al.*, 1995 ; Wang et Weiner, 1995), l'étude du mécanisme catalytique la plus complète est celle qui a été menée par notre équipe sur la GAPN de *Streptococcus mutans* (figure 20 p 31). Par conséquent, ce chapitre lui

Etude bibliographique

sera essentiellement consacré. Il est important de noter que GAPN est l'une des rares ALDH de cette famille pour laquelle le substrat physiologique est identifié. Ainsi les résidus Arg aux positions 124, 301 et 459 mentionnés ci-dessous et indispensables à la reconnaissance du substrat, sont spécifiques de GAPN.

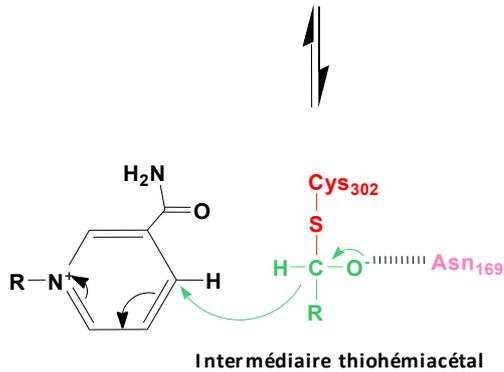
Au niveau de l'étape d'acylation, l'activation de la Cys302 catalytique est dépendante d'un changement conformationnel local du site actif associé à la fixation du cofacteur NADP⁺ et fortement favorisé par la fixation du substrat G3P sur le complexe binaire (vitesse augmentée d'un facteur 10⁶). Cette réorganisation inclut une réorientation des chaînes latérales des résidus Glu268, Cys302 et Arg459 et se traduit par l'augmentation de l'accessibilité et une diminution du pK_{app} de la Cys302 de 8,5 à 6,2, lui conférant ainsi une grande réactivité à pH 7. La stabilisation de la Cys302 sous forme thiolate est assurée par la charge positive du cycle pyridinium du NADP⁺, la chaîne latérale des résidus Asn169 et Arg459, mais également les groupements NH peptidiques des résidus Cys302 et Thr303 (Marchal et Branlant, 1999 ; Cobessi *et al.*, 1999 ; Cobessi *et al.*, 2000). Cette réorganisation conformationnelle n'a pas comme seule conséquence l'activation de la Cys302. En effet, la rupture du pont salin Glu268⁻/Arg459⁺ est un préalable indispensable à la formation d'un complexe ternaire compétent car elle va permettre au résidu Arg459 de jouer son rôle dans la reconnaissance et le positionnement du substrat. Ce rôle est partagé avec les résidus Arg124 et Arg301 (Marchal et Branlant, 2002). L'attaque nucléophile de la Cys302 sur le C₁ du G3P conduit à la formation de l'intermédiaire tétraédrique thiohémiacétal qui est stabilisé sous forme déprotonée par un site de reconnaissance oxyanion, composé de la chaîne latérale du résidu invariant Asn169 et des groupements NH peptidiques des résidus 302 et 303 (Cobessi *et al.*, 2000). Le transfert d'hydrure est donc réalisé sans assistance basique. Cependant, sa stéréospécificité (face ré du cycle nicotinamide, les ALDH non-phosphorylantes étant des déshydrogénases de classe A, Michels *et al.*, 1994) et son efficacité sont dépendantes du positionnement adéquat de la partie NMN du cofacteur, en particulier du cycle nicotinamide, par rapport à l'intermédiaire thiohémiacétal. Deux résidus invariants jouent un rôle essentiel à ce niveau, d'une part le résidu Glu399 dont la chaîne latérale ancre le ribose du NMN *via* des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyles 2' et 3' (Ni *et al.*, 1997 et figure 17 p. 26), et d'autre part, le résidu Thr244. En effet, des études plus récentes ont montré que le groupement β-CH₃ de la Thr244, dont le positionnement est assuré par la liaison hydrogène entre l'ε-NH₂ de la Lys178 et le β-OH de la Thr244, permet au noyau nicotinamide d'adopter une conformation adaptée à un transfert d'hydrure efficace (Pailot *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2006).



La fixation du NADP⁺ et du G3P entraîne un changement conformationnel local du site actif. La forme S⁻ de Cys₃₀₂ est stabilisée par :

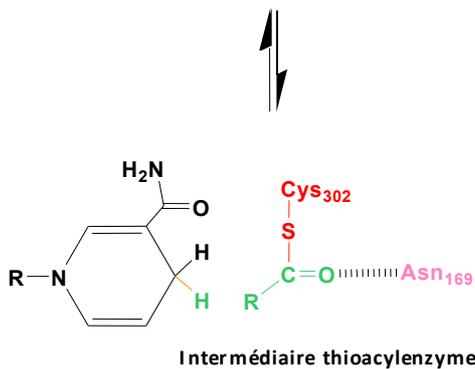
- la charge + du cycle pyridinium du NADP⁺
- les chaînes latérales de Asn169 et Arg459
- les NH peptidiques des résidus 302 et 303

La réaction débute par l'attaque de la Cys₃₀₂ sur le C₁ électrophile du substrat.



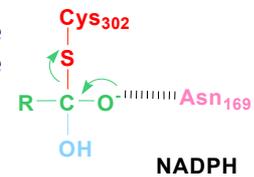
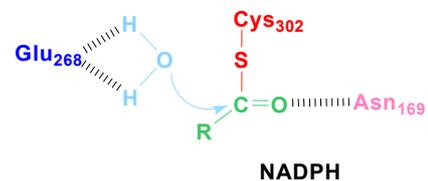
Il y a alors formation de l'intermédiaire hémithioacétal, stabilisé par le site de reconnaissance oxyanion. Ce site permet un transfert d'hydrure efficace sans catalyse basique.

Le groupement β-CH₃ de la Thr244, dont le positionnement est assuré par la liaison hydrogène entre l'ε-NH₂ de la Lys178 et le β-OH de la Thr244, permet au noyau nicotinamide d'adopter une conformation adaptée à un transfert d'hydrure efficace.



Stabilisation de l'intermédiaire thioacylzyme dans le site de reconnaissance oxyanion

Le Glu268 positionne et active H₂O pour une hydrolyse efficace. Il joue aussi le rôle de base à pH ≥ 7,6. Le site de reconnaissance oxyanion stabilise l'intermédiaire formé.



La déprotonation du produit après sa libération rend la réaction irréversible.

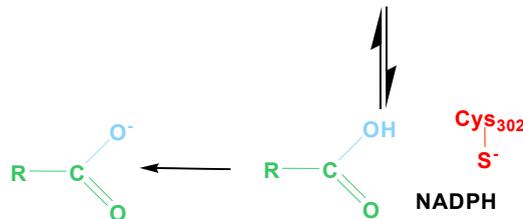


Figure 20 : Représentation du mécanisme catalytique de la GAPN de *S. mutans* (d'après Marchal *et al.*, 2000).

Etude bibliographique

Dans une seconde étape, l'intermédiaire thioacylenzyme va subir l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau qui doit nécessairement être activée. L'efficacité de cette étape cinétiquement limitante pour la réaction globale, est dépendante du résidu Glu268 dont le rôle majeur est d'activer et d'orienter la molécule d'eau attaquant l'intermédiaire thioacylenzyme. De plus, il jouerait un rôle de catalyseur basique à des valeurs de pH où il est sous forme déprotonée (c.à.d. supérieurs à 7,6) (Marchal *et al.*, 2000). Par contre, pour que ce résidu puisse jouer son (ses) rôle(s), il est indispensable que la partie NMNH du cofacteur subisse un changement conformationnel lui permettant d'être positionnée en dehors du site actif (voir § 2.3.3.2. p. 36).

2.3.2.2. ALDH CoA-dépendantes

La MSDH de *B. subtilis* est la seule ALDH CoA-dépendante pour laquelle une étude détaillée du mécanisme catalytique a été entreprise (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006 ; Talfournier *et al.*, 2011). De plus, elle a la particularité de catalyser à la fois une transthioestérification et une β -décarboxylation. Le mécanisme étant globalement similaire à celui décrit ci-dessus pour les ALDH hydrolytiques, l'objectif de ce chapitre n'est pas une description exhaustive des données disponibles mais il s'agit plutôt de mettre en exergue certaines spécificités et/ou différences.

Comme pour la GAPN de *S. mutans*, l'étape d'acylation est très efficace avec une constante de vitesse associée supérieure à 1000 s^{-1} . Par contre, le fait que seules deux sous-unités sur quatre soient actives, démontre que cette MSDH homotétramérique présente des propriétés de réactivité de demi-site vraisemblablement liées à l'existence d'un site fonctionnel par dimère et à l'activation de seulement deux Cys302 par tétramère au niveau du complexe binaire MSDH/NAD. En effet, lors des tests d'activité, une étape préalable d'activation NAD^+ -dépendante est observée et se traduit par l'existence d'une phase de latence. Ce processus d'activation est accompagné d'une réorganisation conformationnelle de l'interface monomère/monomère d'un même dimère comme le suggère la modification des propriétés de fluorescence du résidu Trp468 qui est proche de cette interface. Il conduit également à un abaissement du $\text{p}K_{\text{app}}$ de la Cys302 catalytique d'environ 8,7 à 7,9. La formation du complexe ternaire MSDH/NAD/substrat conduit à une diminution du $\text{p}K_{\text{app}}$ de la Cys302 de 7,9 à environ 5,5 ce qui suggère une réorganisation structurale supplémentaire du site actif lors de la formation du complexe ternaire (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Le mode d'activation de la Cys302 est donc séquentiel, contrairement à ce qui a été montré pour la GAPN de *S. mutans*

(voir § 2.3.2.1. p. 29). L'efficacité de l'étape d'acylation repose également sur 1) la reconnaissance et le positionnement du substrat dans le site actif et dans ce cadre les résidus Arg124 et Arg301 jouent un rôle essentiel en stabilisant le groupement carboxylate du substrat (Talfournier *et al.*, 2011) ; et 2) la présence d'un site de reconnaissance oxyanion (le résidu Asn169 étant conservé) permettant un transfert d'hydrure efficace sans catalyse basique à l'instar des ALDH hydrolytiques.

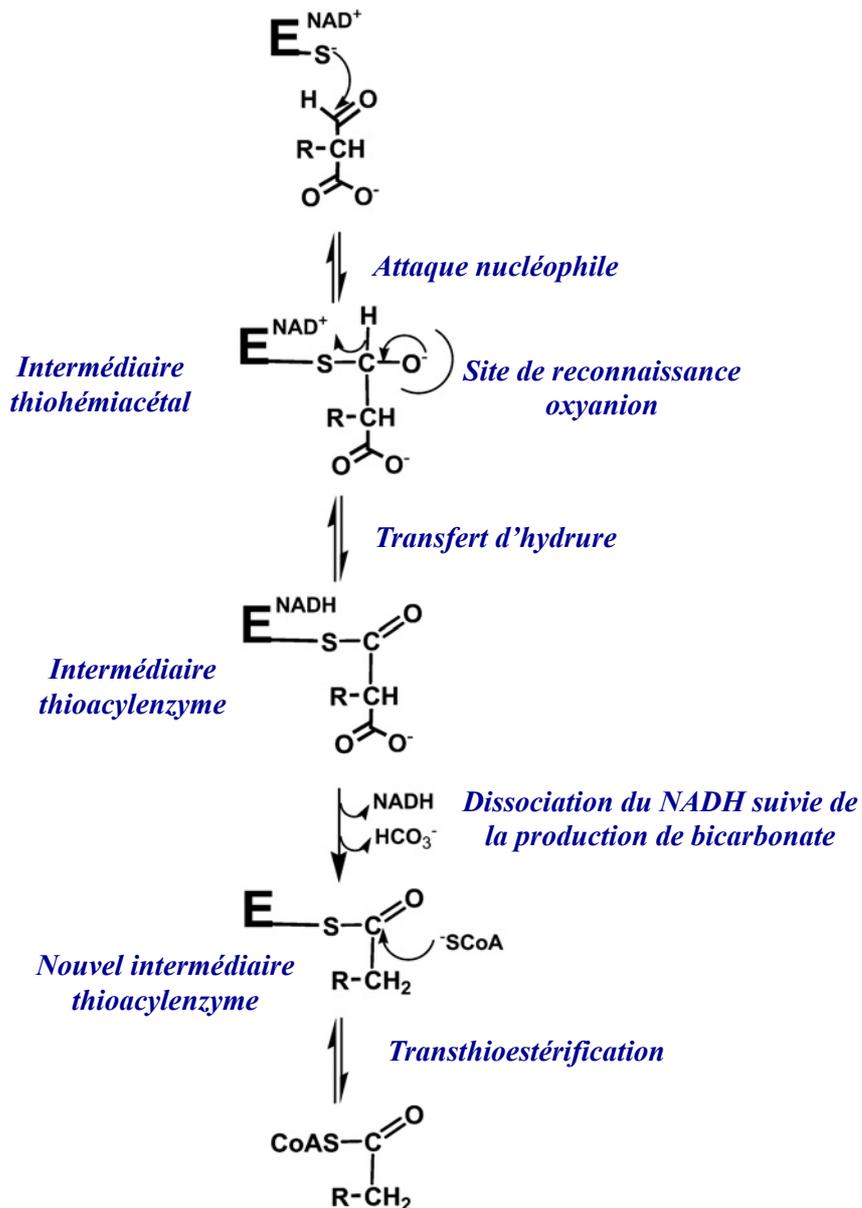


Figure 21 : Représentation du mécanisme catalytique de la MSDH de *B. subtilis* (d'après Stines-Chaumeil *et al.*, 2006).

R représente un groupement CH₃ dans le MMSA (Méthylmalonate semialdéhyde) et le PPCoA (Propionyl-CoA), tandis que R représente un atome d'hydrogène dans le MSA (Malonate semialdéhyde) et l'acétyl-CoA.

Etude bibliographique

L'étape cinétiquement limitante est associée à la réaction de β -décarboxylation, qui se produit sur l'intermédiaire thioacylenzyme et conduit à la formation de bicarbonate. Le fait que cette étape ait lieu après la dissociation du NADH et avant l'étape de transthioestérification, est en faveur d'un mécanisme cinétique de type ping-pong comme indiqué précédemment (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006 et § 2.3.1. p. 29). Enfin des études récentes ont permis de montrer que la liaison du CoA à la MSDH permet son positionnement optimal par rapport à l'intermédiaire thioacylenzyme qui se traduit par une efficacité de l'étape de transthioestérification au minimum 10^4 fois supérieure à celle d'un modèle chimique et une diminution de 3 unités du pK_{app} de sa fonction thiol (Talfournier *et al.*, 2011). Le mécanisme réactionnel proposé est représenté figure 21.

2.3.3 Importance de la dynamique au cours de la catalyse

2.3.3.1. Formation d'un complexe michaelien compétent

Les études réalisées par notre équipe sur la GAPN de *S. mutans* avaient permis de mettre en évidence le rôle essentiel des réarrangements conformationnels locaux dans la formation d'un complexe Michaelien compétent. Comme indiqué précédemment (§ 2.3.2.1. p 29), cette réorganisation, restreinte à des réorientations de chaînes latérales au niveau du site actif et induite par la liaison du cofacteur NAD(P), est fortement favorisée au niveau cinétique par la formation du complexe ternaire GAPN/NADP/G3P. Comme le suggèrent les études réalisées par microcalorimétrie de balayage, cette réorganisation conformationnelle aurait également comme conséquence une augmentation de la flexibilité de la chaîne polypeptidique qui se traduit par une diminution de la thermostabilité de l'enzyme. Il a donc été proposé que la dynamique conformationnelle associée à la formation de complexes GAPN/ligand(s) constituait un mécanisme permettant à l'enzyme d'acquérir la flexibilité conformationnelle indispensable à une catalyse efficace (Rahuel-Clermont *et al.*, 2005).

Cependant, dans le cas de la RALDH2 (ALDH1A2), les changements conformationnels observés ne se limitent pas à la plasticité des chaînes latérales des acides aminés au site actif, ni à la flexibilité du cofacteur contrairement à la plupart des ALDH (voir le paragraphe suivant). Par comparaison, la structure cristalline du complexe RALDH1 (ALDH1A1) / NAD révèle que le site de liaison du substrat est un tunnel possédant une entrée large permettant l'accès du rétinol. L'entrée de ce tunnel est formée des hélices α_C (résidus 114-135) et α_D (résidus 170-185) et des résidus 455-461 appartenant à une grande boucle (455-477) localisée en surface, alors que sa base est constituée de l'hélice α_H (résidus 282-296), située à proximité de la Cys302 catalytique, et des

brins β_{10} et β_{11} qui sous-tendent les résidus Thr244 et Glu268 (Moore *et al.*, 1998). Alors que ces éléments de structure secondaires sont également retrouvés dans le complexe RALDH2/NAD, la boucle de 17 résidus (462-477) est absente de la densité électronique (Lamb et Newcomer, 1999). Par conséquent, la flexibilité de cette boucle pourrait jouer un rôle primordial au cours du cycle catalytique (Bordelon *et al.*, 2003), sans que ce rôle n'ait été encore défini ou associé à la reconnaissance du substrat (figure 22).

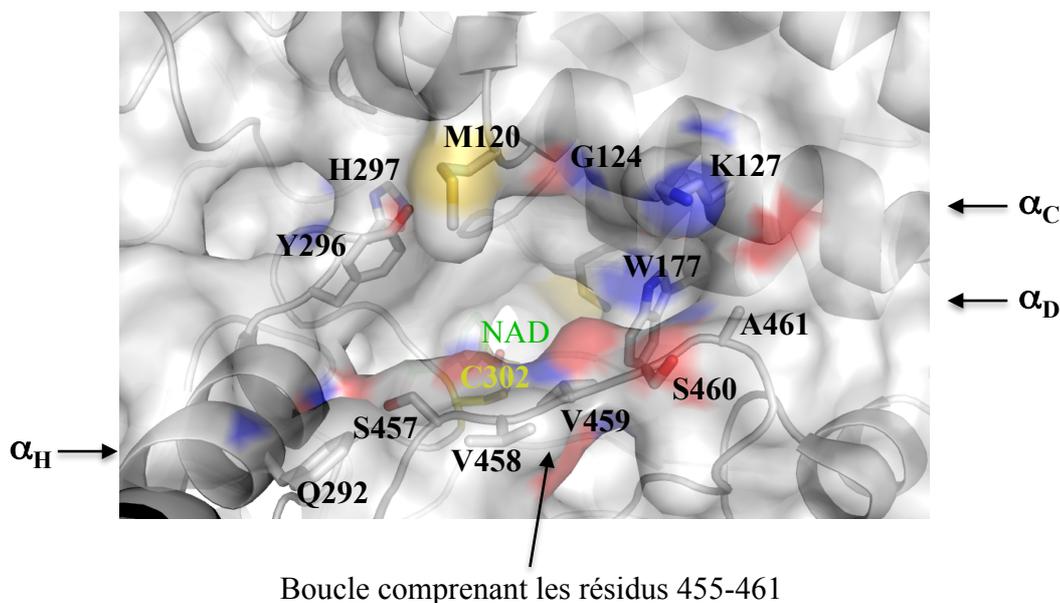


Figure 22 : Vue d'ensemble du canal d'accès du substrat dans la RALDH1 de mouton (code 1BXS, Moore *et al.*, 1998).

La dynamique conformationnelle associée à la formation d'un complexe ALDH/NAD(P)/substrat compétent s'inscrit également dans la problématique plus générale des propriétés de coopérativité que présentent certaines ALDH. Ces propriétés, qui ont été interprétées comme une forme extrême de coopérativité négative, se traduisent au niveau cinétique par une réactivité de demi-site correspondant à une sous-unité active par dimère au sein du dimère de dimères (Zhou et Weiner, 2000 ; Hurley *et al.*, 2001 ; Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Dans le cas de la MSDH, il a d'ailleurs été établi que deux populations de sites actifs non-équivalentes préexistaient dans la forme apo de l'enzyme, ce qui conduirait en présence de substrats aux propriétés de coopérativité. Au sein de chaque dimère, la flexibilité conformationnelle de la région 453-467 participant à l'interface inter-monomère serait impliquée dans la transmission du message conduisant à la coopérativité (Stines-Chaumeil,

Etude bibliographique

2006 ; Larson *et al.*, 2005). Le fait que la dynamique conformationnelle associée à cette boucle soit impliquée dans la formation d'un complexe michaélien compétent est à rapprocher de son rôle supposé dans la reconnaissance du rétinol par la RALDH2.

2.3.3.2. Dynamique conformationnelle du cofacteur

Une revue de la littérature montre que dans la quasi-totalité des structures cristallines d'ALDH hydrolytiques en complexe avec le NAD(P), la partie NMN du cofacteur est très flexible, en particulier le cycle nicotinamide. Cette flexibilité conformationnelle a également été mise en évidence par des études RMN. Par contre, dès que l'intermédiaire thiohémiacétal est formé, il est indispensable que le cycle nicotinamide soit positionné de façon à permettre un transfert d'hydrure stéréospécifique et efficace (voir résultats partie 2 p. 74). A l'inverse, un positionnement similaire de la partie NMNH ne permettrait pas à l'hydrolyse d'avoir lieu car elle empêcherait le résidu Glu268 de jouer son rôle dans cette étape. Le mécanisme cinétique étant de type séquentiel ordonné, le cofacteur réduit se dissocie en dernier de l'enzyme. Cela a conduit à suggérer qu'un mouvement de la partie NMNH était un préalable à l'étape d'hydrolyse. Dans deux des premières structures, la partie NMN du cofacteur adoptait une conformation qui avait été jugée compatible avec la désacylation (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Moore *et al.*, 1998). Par rapport à la conformation dite "transfert d'hydrure", la partie NMN adopte une conformation plus contractée avec un mouvement de retrait du cycle nicotinamide par rapport au site actif grâce à des rotations autour des liaisons du pyrophosphate.

Les structures de différents complexes obtenus pour l'ALDH2 humaine avaient conduit les auteurs à proposer une corrélation entre état d'oxydation du cofacteur et conformation : conformation "transfert d'hydrure" pour le NAD et conformation "hydrolyse" pour le NADH (Perez-Miller et Hurley, 2003 ; figure 23). Cependant, l'état redox du cofacteur n'est sans doute pas le facteur clé qui va provoquer l'isomérisation du cofacteur comme le montrent les structures de la GAPN de *Thermoproteus tenax* en complexe avec le cofacteur NAD ou l'inhibiteur NADPH dans lesquelles seule une conformation "transfert d'hydrure" est observée (Lorentzen *et al.*, 2004).

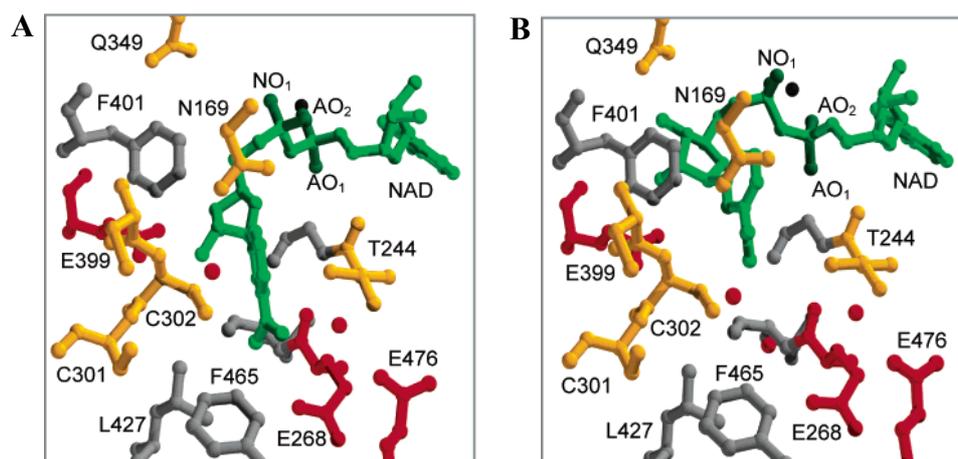


Figure 23 : Vues des conformations observées dans le site actif de l'ALDH2 humaine (d'après Perez-Miller et Hurley, 2003).

A : conformation dite « transfert d'hydrure ». **B** : conformation dite « hydrolyse ». Les atomes d'oxygène du pont pyrophosphate du cofacteur sont représentés en vert foncé. Les atomes NO1 et AO2, qui interagissent avec l'ion Mn^{2+} (en noir), pointent vers l'arrière sur cette figure alors que les molécules d'eau sont représentées en rouge. Pour des raisons de lisibilité, seule la chaîne latérale du résidu N169 a été représentée.

Plus récemment des travaux réalisés par notre équipe en collaboration avec l'équipe de Biocristallographie de Nancy (UMR 7036 CNRS-Université de Lorraine), ont permis d'obtenir la première preuve expérimentale d'une isomérisation conformationnelle du cofacteur au cours du cycle catalytique des ALDH hydrolytiques (D'Ambrosio *et al.*, 2006). Pour ce faire, la structure de l'intermédiaire covalent thioacylenzyme du variant E268A de la GAPN de *S. mutans* a été obtenue en faisant diffuser le substrat G3P dans le complexe binaire E268A-GAPN/NADP. Cette structure a révélé qu'après l'acylation, un basculement de la partie NMNH en dehors du site actif se produit. De plus, une corrélation a été proposée entre les deux conformations identifiées pour la partie NMNH et l'existence de deux conformations pour la chaîne latérale de la Cys302 catalytique (une conformation pour la forme acylée et une autre pour la forme libre). Ces deux conformations du cofacteur sont très différentes de celles décrites précédemment et elles positionnent la partie NMNH dans une cavité composée de résidus conservés dans les ALDH hydrolytiques (figure 24).

Par conséquent, il a été proposé que cette cavité constitue la porte de sortie du cofacteur réduit non seulement dans la GAPN de *S. mutans* mais également dans l'ensemble des ALDH hydrolytiques.

Etude bibliographique

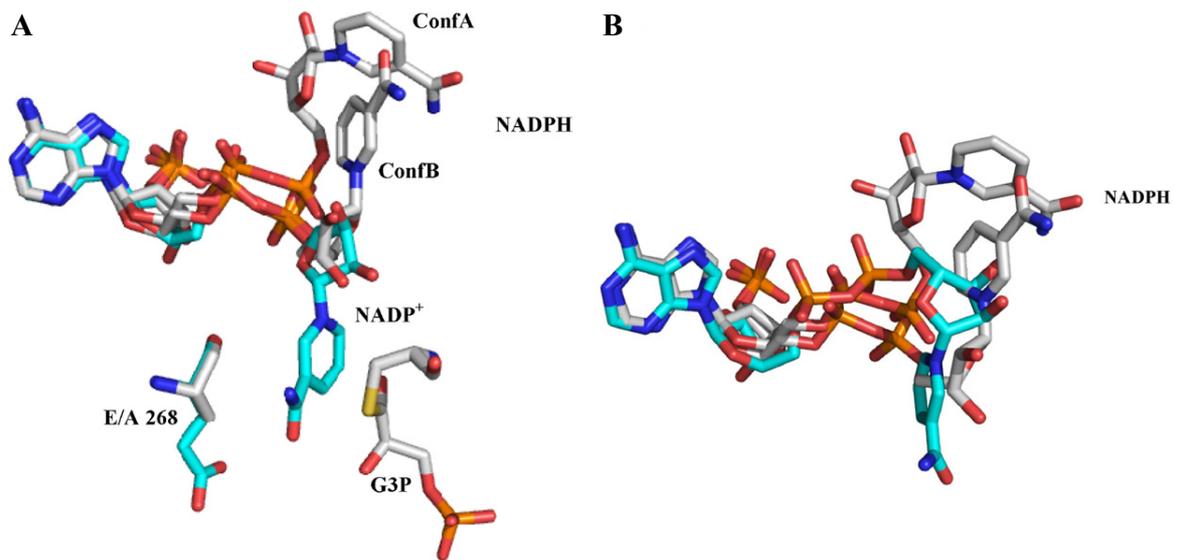


Figure 24 : **A** : Superposition des structures tridimensionnelles du complexe ternaire non covalent (conformation transfert d'hydrure, Cobessi *et al.*, 2000) représenté en cyan, et de l'intermédiaire thioacylenzyme (D'Ambrosio *et al.*, 2006) représentant les conformations adoptées par le cofacteur au cours des étapes d'acylation et de désacylation. ConfA (où le NMNH est plus exposé au solvant) et ConfB représentent deux conformations du NADPH observées. **B** : Superposition du NADPH sous ses formes ConfA et ConfB (en gris) (D'Ambrosio *et al.*, 2006) et du NADH (en cyan) dans le complexe binaire ALDH2/NADH (Perez-Miller et Hurley, 2003).

Objectifs

Dans les ALDH non phosphorylantes, la catalyse est intimement liée à la notion de dynamique conformationnelle au sein du site actif, et ce à différentes étapes du chemin réactionnel. Des études précédentes ont montré que des réorganisations conformationnelles affectant la chaîne polypeptidique et le cofacteur sont indispensables à la formation d'un complexe michaélien efficace mais également à l'étape de désacylation. Mon projet de thèse s'inscrit dans cette thématique générale et s'articule autour de deux axes :

Dans la RALDH2, une des ALDH impliquées dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque, les données disponibles au début du projet suggéraient que la réaction d'oxydation du rétinol était associée à des changements conformationnels au sein du site actif. Dans ce contexte, un de mes objectifs a consisté à identifier les bases moléculaires de la reconnaissance du rétinol en développant une méthodologie spécifique associant l'analyse du mécanisme enzymatique et l'étude de la formation du complexe michaélien. La généralité de ce mode de reconnaissance a été évaluée pour deux des ALDH présentant une activité rétinol déshydrogénase : la RALDH1 et la RALDH2.

Le second axe de mon projet a été consacré à l'étude de la dynamique du cofacteur réduit au cours de la catalyse :

- En vue de caractériser le processus d'isomérisation du cofacteur mis en évidence pour la GAPN de *S. mutans*, mon objectif était de développer une méthode permettant de suivre ce basculement au cours de la catalyse et d'établir un modèle cinétique pour déterminer la constante de vitesse intrinsèque associée à cette étape. Par ailleurs, la question de l'existence même de cette étape était posée pour les ALDH CoA-dépendantes. Cette étude a donc été entreprise à la fois sur des ALDH hydrolytiques et une ALDH CoA-dépendante.

- Enfin, j'ai cherché à identifier les bases moléculaires responsables de la dissociation tardive du cofacteur au cours du cycle catalytique des ALDH hydrolytiques ou précoce dans le cas des ALDH CoA-dépendantes. Cette étude s'inscrivait dans une thématique plus générale visant à comprendre l'évolution des mécanismes catalytiques dans la superfamille des ALDH.

Pour aborder les différents aspects de mon projet, j'ai utilisé des techniques cinétiques - classiques, rapides, systèmes enzymatiques couplés - combinées à l'exploitation de propriétés de fluorescence (FRET, anisotropie), dans le cadre d'une étude de relation structure/fonction.

Résultats
PARTIE 1

Bases moléculaires de la reconnaissance du rétinol par les RALDH

1. Contexte et objectif général

Le potentiel des rétinoïdes seuls ou couplés à d'autres agents dans le traitement des cancers réside dans l'inhibition de croissance ou l'induction de la différenciation ou de l'apoptose cellulaires (Gudas *et al.*, 2012 ; Maden, 2007 ; Noy, 2010 ; Soprano *et al.*, 2007), *via* l'activation de la transcription de gènes cibles par les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (AR). Au niveau clinique, l'efficacité de l'AR ainsi que de dérivés synthétiques a été montrée dans le traitement et la prévention de nombreux types de cancers (Altucci et Gronemeyer, 2001 ; Niles, 2004). Cependant, le développement de ces traitements a été limité en raison de la toxicité élevée, du métabolisme rapide de l'AR et de l'adaptation aux traitements (Farhana *et al.*, 2010).

En raison de ces rôles multiples, les effets de l'AR doivent être étroitement contrôlés dans le temps et l'espace *via* la coordination des voies de biosynthèse et de dégradation. *In vivo*, la biosynthèse de l'AR est un processus maîtrisé, *via* l'oxydation réversible de la vitamine A (rétinol) en rétinol par une alcool déshydrogénase qui constitue l'étape limitante de la biosynthèse, suivie de l'oxydation irréversible du rétinol en AR par une RALDH. Dans l'optique de mettre au point de nouveaux traitements fondés sur l'activation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs par des rétinoïdes, il est essentiel de tenir compte du caractère toxique de l'AR, d'où l'idée de produire ces dérivés actifs de l'AR *in situ*, en quantités pas ou peu toxiques. Pour cela, l'activité RALDH des enzymes responsables de la biosynthèse de l'AR pourrait être mise à profit *via* la conception de dérivés du rétinol, précurseurs de dérivés de l'AR possédant une activité ciblée et/ou une résistance aux processus d'inactivation, à condition que la structure des dérivés du rétinol soit compatible avec la poche de spécificité de substrat de ces enzymes. Ce principe permettrait d'éviter l'utilisation directe de fortes concentrations d'AR, dont la toxicité est un frein pour la thérapie et/ou la prévention anticancéreuse à long terme. Par exemple, l'étude des effets de l'application directe de rétinol en dermatologie a permis de montrer sa métabolisation en AR, avec des effets biologiques similaires à ceux résultant de l'application directe d'AR à des concentrations plus élevées (Didierjean *et al.*, 1996 ; Tran *et al.*, 2005). Dans cette optique, la caractérisation des bases moléculaires de la reconnaissance du rétinol par les enzymes responsables de la conversion du rétinol en AR est une donnée indispensable et un préalable à la conception de précurseurs de dérivés de l'AR.

Résultats : Partie 1

Ceci est d'autant plus justifié que les concentrations intracellulaires de rétinoïdes, en particulier de rétinol, sont très faibles (Malpeli *et al.*, 1995). En effet, ces faibles concentrations résultent non seulement d'une synthèse cinétiquement limitante mais également d'une séquestration par des protéines de transport de la famille des CRBP (Pares *et al.*, 2008 ; Napoli, 2012 ; Napoli, 1986 ; Wang *et al.*, 2011 ; Malpeli *et al.*, 1995). Par conséquent, le rôle biologique des RALDH dépend d'un mode de reconnaissance assurant une spécificité/affinité élevée pour le rétinol.

Le projet a été abordé sur la RALDH1 et la RALDH2, deux enzymes dont la structure tridimensionnelle était disponible sous forme de complexe binaire avec le cofacteur NAD (codes pdb 1bxs, Moore *et al.*, 1998 et 1bi9, Lamd et Newcomer, 1999).

2. Travaux préliminaires

2.1. Clonage, production et purification

En préalable à cette étude, nous avons mis au point les protocoles de production et de purification des RALDH1 et 2 en système bactérien *E. coli*.

2.1.1. RALDH1 humaine

La RALDH1 humaine recombinante est produite à partir d'un vecteur dérivé du pET20b par sous-clonage de la séquence codante issue du clone IRAUp969H0146D (consortium IMAGE). La séquence clonée entre les sites *Nde*1 et *Eco*R1 est placée sous la dépendance du promoteur T7 (vecteur pET/RALDH1).

La RALDH1 a été produite dans la souche d'*E. coli* C41(DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET/RALDH1. La production a été réalisée dans le milieu auto inductible ZYM 5052 pendant 16h à 37°C. Le procédé de purification mis au point comporte quatre étapes : les protéines solubles récupérées dans le surnageant de sonication subissent une précipitation au sulfate d'ammonium avant d'être déposées sur une colonne de filtration sur gel (ACA34). Cette étape est suivie d'une chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sepharose) et d'une chromatographie d'interactions hydrophobes (Phényl-Sepharose). A ce stade, la RALDH1 est purifiée à homogénéité et le rendement de purification est d'environ 200 mg par litre de culture (figure 25 et tableau 1).

Etapes	Volume (mL)	DO _{280 nm}	DO _{280 nm} * Volume (mL)	DO _{260 nm}	DO ₂₈₀ / DO ₂₆₀
SSO	35	110	3867	173	0,6
C _{50 %}	15	197	2966	282	0,7
ACA 34	175	4,5	789	5,5	0,8
Q Sepharose	84	6,7	561	4,3	1,5
Phényl Sepharose	125	3,4	459	2,3	1,6
Concentration	50	9	447	5	1,8

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de la purification de la RALDH1 humaine

La purification a été réalisée à partir de 2L de cultures de cellules d'*E. coli* C41 (DE3) transformées avec le plasmide pET / RALDH1. Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans du milieu ZYM 5052 additionné d'ampicilline (200 mg/L) pendant 16h. Toute la purification a été réalisée en tampon KPi 20 mM, pH 7,5.

SSO : surnageant de sonication ; C_{50%} : culot de précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium ; ACA34 : protéines éluées après ACA34 ; Q Sepharose : protéines éluées après colonne Q-Sepharose ; Phényl Sepharose : protéines éluées après colonne Phényl Sepharose.

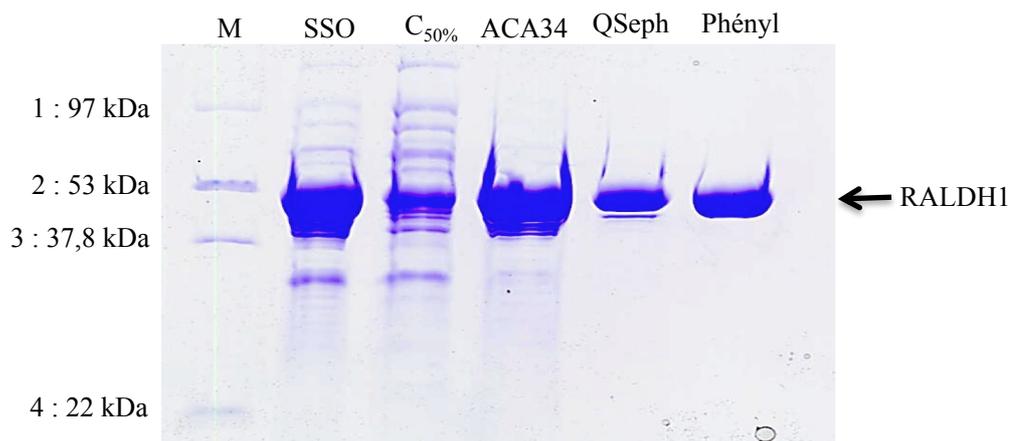


Figure 25 : Analyse des étapes de purification de la RALDH1 humaine par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 10 %.

Le marqueur de taille utilisé comme témoin comporte : 1) T7 ARN Polymérase 97 kDa, 2) RALDH2 53 kDa, 3) GAPDH 37,8 kDa, 4) MsrA 22 kDa.

M : Marqueur de taille ; SSO : surnageant de sonication ; C_{50%} : culot de précipitation ; ACA34 : protéines éluées après ACA34 ; QSeph : protéines éluées après Q-Sepharose ; Phényl : protéines éluées après Phényl-Sepharose.

2.1.2. RALDH2 de rat

A l'origine nous disposions du plasmide pET/RALDH(IIL) qui nous avait été généreusement fourni par le Pr J.L Napoli (UC Berkeley, Wang *et al.*, 1996). Cependant, la RALDH2 produite présentait une extension de 11 résidus du côté N-terminal. La séquence codant la forme de la RALDH2 "native" de 499 résidus a donc été sous-clonée entre les sites *Nde1* et *BamH1* du vecteur d'expression pET14b et placée sous le contrôle du promoteur T7. Cette construction permet de produire une forme de la RALDH2 portant une étiquette His N-terminale (désignée par RALDH2 dans la suite du manuscrit).

La RALDH2 a été exprimée dans la souche d'*E. coli* C41(DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET/RALDH2. La production a été réalisée dans le milieu auto inductible ZYM 5052 pendant 16h à 37°C. La RalDH2 est purifiée par chromatographie d'affinité de type Ni-Sépharose. La concentration optimale en imidazole permettant une fixation spécifique de la RalDH2 est de 50 mM. La protéine a été éluée en un seul pic après un palier à une concentration en imidazole de 500 mM. A ce stade, la RALDH2 est purifiée à homogénéité et le rendement de purification est d'environ 70 mg environ par litre de culture (figure 26 et tableau 2).

Etapes	DO_{280 nm}	DO_{280 nm} * volume (mL)	DO_{260 nm}	DO₂₈₀ / DO₂₆₀
SSO	88	4480	160	0,6
Dialyse	70	3640	126	0,6
Ni-Sépharose	9,1	68	5,9	1,5

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de la purification de la RALDH2 de rat.

La purification a été réalisée à partir d'un litre de culture de cellules d'*E. coli* C41 (DE3) transformées avec le plasmide pET / RALDH2. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans du milieu ZYM 5052 additionné d'ampicilline (200 mg/L) pendant 16 h. Toute la purification a été réalisée en tampon KPi 20 mM, KCl 1M, pH 7,5.

SSO : surnageant de sonication ; Dialyse : surnageant dialysé contre du tampon de purification et filtré; Ni-Sépharose : protéines éluées après Ni-Sépharose.

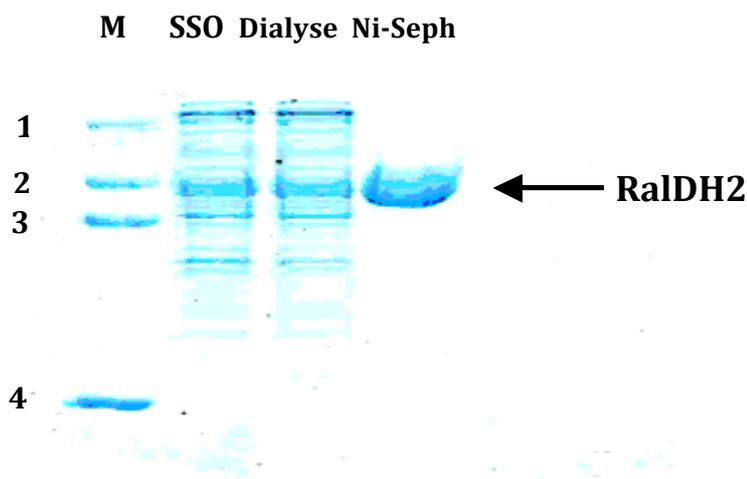


Figure 26 : Analyse des étapes de purification de la RALDH2 de rat par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 10%.

Le marqueur de taille utilisé comme témoin comporte : 1) T7 ARN polymérase 97 kDa, 2) GAPN 53 kDa, 3) GAPDH 37,8 kDa, 4) MsrA 22 kDa.

M : Marqueur de taille, SSO : surnageant de sonication, Dialyse : surnageant dialysé contre du tampon de purification et filtré; Ni-Seph : protéines éluées après Ni-Sepharose.

2.2. Mise au point des conditions d'études de la réaction d'oxydation du rétinol par les RALDH

Compte-tenu de la faible solubilité des rétinoïdes en milieu aqueux ($< 1 \mu\text{M}$, Szuts et Harosi, 1991), il était crucial de mettre au point des conditions de solubilisation compatibles avec l'activité enzymatique et avec les concentrations requises pour la mesure des paramètres cinétiques. Pour cela, plusieurs types de solvants et de détergents non-ioniques ont été testés du point de vue de leur efficacité de solubilisation du rétinol *tout-trans* (rétinol) et de leur neutralité vis-à-vis de l'activité enzymatique (validée en utilisant un substrat non rétinoïde).

Des études précédentes réalisées au laboratoire par le Dr S. Rahuel-Clermont avaient montré que le Tween 80, un détergent micellaire, permet une bonne solubilisation à 0,05 % (soit environ $380 \mu\text{M}$ pour concentration micellaire critique de $12 \mu\text{M}$). Cependant le fait que ce détergent solubilise vraisemblablement le rétinol au sein de micelles soulevait la question de la disponibilité de ce substrat. Dans ce cas le processus de libération du rétinol pourrait être la cause d'artéfacts au niveau cinétique. Par conséquent, la solubilité du rétinol a été testée dans un solvant organique non micellaire, le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD).

Les tests de solubilisation du rétinol ont été réalisés en milieu aqueux et en présence d'un pourcentage croissant de solvant MPD, en partant du principe que la DO_{384} reflète la concentration de rétinol soluble (Szutz et Harosi, 1991). D'après ce critère, la fraction de rétinol soluble atteint un plateau à environ 40 % de MPD.

Résultats : Partie 1

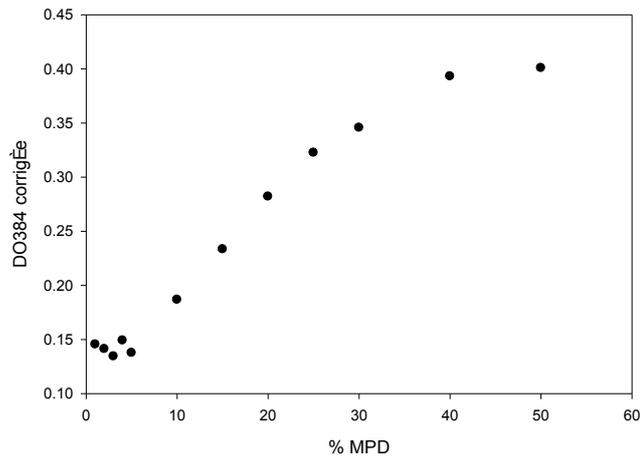


Figure 27 : Variation de la solubilité du rétinol en fonction de la concentration de solvant MPD. La concentration en rétinol est fixée à 11.8 μM , ce qui correspond à une DO d'environ 0.5 dans l'éthanol. La DO mesurée à la longueur d'onde maximale d'absorption du rétinol a été corrigée en tenant compte du facteur dilution.

Pour évaluer l'impact de la présence de MPD à des concentrations aussi élevées sur l'activité rétinol déshydrogénase, des tests d'activité à l'état stationnaire ont été effectués sur la RALDH2 dans le tampon d'activité contenant un pourcentage croissant de MPD. A titre de contrôle, des essais ont été réalisés en utilisant un analogue de substrat, le décanol, qui présente des cinétiques à l'état stationnaire identiques en présence ou en absence de Tween 80. Dans ce cas l'activité n'est pas modifiée jusqu'aux concentrations supérieures à 20 % en MPD. C'est également le cas en présence de rétinol. Par contre, à 30 % de MPD, la vitesse globale de la réaction est diminuée de moitié dans les deux cas. L'utilisation d'une solution comprenant 20 % de MPD est donc un bon compromis entre solubilisation du rétinol et maintien de l'activité de l'enzyme.

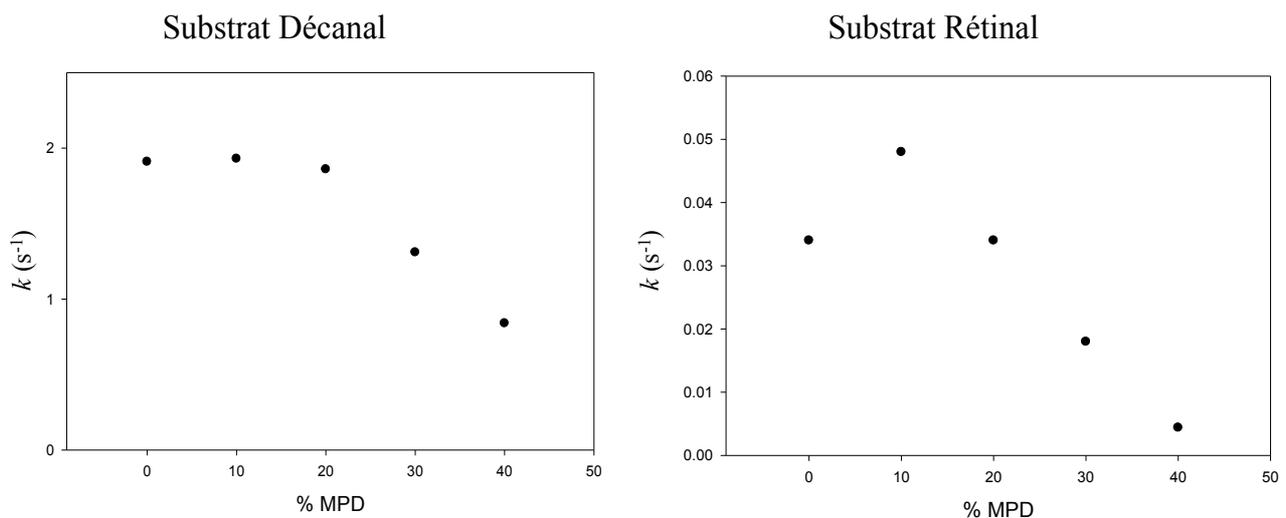


Figure 28 : Variation de l'activité de la RALDH2 en fonction de la concentration de MPD, en présence de substrat décanol ou rétinol. La concentration en enzyme est fixée à 0,125 μN pour les tests avec Décanol, et à 2,5 μN pour ceux avec rétinol. La concentration en décanol est fixée à 50 μM et celle en rétinol à 10 μM . La concentration en NAD est fixée à 2 mM.

Après avoir défini les conditions expérimentales pouvant être utilisées à l'état stationnaire, il était indispensable de vérifier que la présence de MPD à 20 % ne modifiait pas la nature de l'étape limitante de la réaction globale. Dans des études antérieures, le signal d'émission de fluorescence du NADH avait été utilisé pour suivre la réaction d'oxydation du décanal à l'état préstationnaire. En présence de Tween 80, un saut de production de NADH avait été observé avec une constante de vitesse associée supérieure au k_{cat} (36 s^{-1} versus $2,2 \text{ s}^{-1}$). Ce résultat montrait donc que l'étape limitante de la réaction est située après le transfert d'hydrure. Des tests similaires ont donc été réalisés en présence de 20 % de MPD, et aucune différence n'a été observée par rapport aux résultats obtenus en présence de Tween 80. A une concentration de 20 %, le MPD pouvait donc être utilisé pour entreprendre une étude du mécanisme catalytique avec le rétinol.

3. Stratégie expérimentale et principaux résultats

Les études antérieures à mon travail de thèse concernant la spécificité de substrat des RALDH ont été abordées *via* des études structurales sur les RALDH1 et 2 et *via* une étude enzymatique sur la RALDH2 utilisant des substrats modèles autres que le rétinol (Bordelon *et al.*, 2003). Dans le cas de la RALDH2, ces études suggéraient le rôle d'une transition conformationnelle de la région désordonnée 462-477 de la structure au cours du cycle catalytique, sans que ce rôle ne soit défini ou associé à la reconnaissance du substrat. Dans le but de définir les bases moléculaires de la reconnaissance spécifique du rétinol, il était donc nécessaire d'explorer le mécanisme catalytique de la réaction avec le rétinol comme substrat, par comparaison à d'autres substrats modèles de structure et de flexibilité conformationnelle variables. En effet, dans l'hypothèse de l'existence d'un réarrangement conformationnel, les propriétés physico-chimiques de mobilité et de flexibilité du substrat pouvaient avoir un impact sur la catalyse. Les résultats obtenus établissent pour les RALDH1 et 2, que le mécanisme catalytique diffère pour les substrats insaturés comme le rétinol par rapport aux substrats possédant une chaîne aliphatique saturée comme le décanal. Dans ce dernier cas, l'étape limitante de la réaction est associée à la désacylation, alors que dans le cas du substrat naturel, elle est associée à l'acylation.

Au cours de l'acylation, plusieurs processus peuvent être cinétiquement limitants, le premier étant l'étape de liaison des substrats et/ou de réorganisation conformationnelle éventuellement associée. Afin de pouvoir étudier le mécanisme de reconnaissance du rétinol, nous devons mettre au point des méthodes permettant de suivre spécifiquement la formation des complexes enzyme-substrat. Pour cela, nous avons utilisé les propriétés de fluorescence du rétinol dont la structure ne

Résultats : Partie 1

se distingue de celle du rétinol que par sa fonction alcool. Deux techniques ont été utilisées: d'une part l'anisotropie de fluorescence qui permet de suivre globalement la formation des complexes, et d'autre part le signal de FRET entre la protéine *via* un ou plusieurs résidus Trp et le rétinol, qui permet de détecter des changements de positionnement au sein du site actif. Après avoir mis en évidence l'existence d'un tel signal de FRET, qui s'est révélé résulter d'un transfert entre le Trp177 situé dans le tunnel de liaison du substrat et le rétinol, nous avons utilisé cette sonde spectroscopique pour étudier la cinétique d'interaction entre les enzymes et le rétinol sur un appareil de stopped-flow. Dans les deux cas, cette approche permet de révéler deux phases: après l'entrée du rétinol dans le tunnel de liaison qui correspondrait à la première phase, le complexe subit une transition conformationnelle au cours de laquelle la distance et l'orientation relatives du Trp177 et du rétinol changent, ce qui se traduit par une deuxième phase plus lente.

Comparée à la cinétique de la réaction globale d'oxydation du rétinol, la constante de vitesse de cette phase attribuée à un changement conformationnel du complexe enzyme-rétinol est du même ordre de grandeur que la constante catalytique mesurée avec le rétinol pour substrat. Ceci suggère que cette réorganisation structurale du complexe contribuerait significativement au contrôle cinétique de la réaction de biosynthèse de l'acide rétinoïque. Ce processus constituerait donc un mécanisme assurant la spécificité de la reconnaissance du rétinol, puisqu'il est corrélé à la structure chimique de la chaîne carbonée du substrat.

Enfin ces approches nous ont permis d'initier une étude du rôle de certains résidus composant le tunnel d'accès du substrat par mutagenèse dirigée, afin d'identifier les éléments structuraux participant et/ou contrôlant cette étape de réarrangement conformationnel du complexe RALDH1/rétinol.

Publication: « Retinoic acid biosynthesis catalyzed by retinal dehydrogenases relies on a rate-limiting conformational transition associated with substrate recognition »

En révision pour *Chem. Biol. Interact.*

Retinoic acid biosynthesis catalyzed by retinal dehydrogenases relies on a rate-limiting conformational transition associated with substrate recognition

Raphaël Bchini^a, Vasilis Vasiliou^b, Guy Branlant^a, François Talfournier^a, Sophie Rahuel-Clermont^{a*}

^aUnité Mixte de Recherche CNRS-Université de Lorraine 7214 AREMS, ARN-RNP structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Faculté de médecine, Biopôle, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Colorado Denver, 12850 East Montview Blvd., Aurora, CO 80045, USA

* Corresponding author. Tel.: +33 383 685 541; fax +33 383 685 509
e-mail address: sophie.rahuel@univ-lorraine.fr

Abbreviations

ALDH, aldehyde dehydrogenase; FRET, fluorescence resonance energy transfer; Hepes, hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid; MPD, 2-methyl-2,4-pentanediol; retinal: all trans-retinaldehyde; retinol, all trans-retinol; RALDH: retinal dehydrogenase; RA: all trans-retinoic acid

Keywords

Aldehyde dehydrogenase, retinal, molecular recognition, conformational flexibility

Résultats : Partie 1

Highlights

Retinal dehydrogenase catalytic mechanism is explored by presteady state kinetics

The rate-limiting step of retinal dehydrogenases depends on the nature of substrate

Retinol fluorescence properties reveal retinoid binding and recognition mechanism

Substrate specificity of retinal dehydrogenases relies on conformational transition

Abstract

Retinoic acid, a metabolite of vitamin A, exerts pleiotropic effects throughout life in vertebrate organisms. Thus, RA action must be tightly regulated through the coordinated action of biosynthetic and degradating enzymes. The last step of retinoic acid biosynthesis is irreversibly catalyzed by the NAD-dependent retinal dehydrogenases (RALDH), which are members of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily. Low intracellular retinal concentrations imply efficient substrate molecular recognition to ensure high affinity and specificity of RALDHs for retinal. This study addresses the molecular basis of retinal recognition in ALDH1A1 (RALDH1) and ALDH1A2 (RALDH2), through the comparison of the catalytic behavior of retinal analogs and use of the fluorescence properties of retinol. We show that, contrary to long chain unsaturated substrates, the rate-limiting step of retinal oxidation by RALDHs is associated with acylation. Use of the fluorescence resonance energy transfer upon retinol interaction with RALDHs provides evidence that retinal recognition occurs in two steps: binding into the substrate access channel, and a slower structural reorganization with rate constant of the same magnitude as the k_{cat} for retinal oxidation: 0.18 vs. 0.07 s^{-1} and 0.25 vs. 0.1 s^{-1} for RALDH1 and RALDH2, respectively. This suggests that the conformational transition of the RALDH-retinal complex significantly contributes to the rate-limiting step that controls the kinetics of retinal oxidation, as a prerequisite for the formation of a catalytically competent complex. This transition provides a mechanism for the specificity of retinal recognition by RALDH1 and RALDH2. This conclusion is consistent with the general notion that structural flexibility within the active site of ALDH enzymes has been shown to be an integral component of catalysis.

1. Introduction

All trans-retinoic acid (RA), the most potent metabolite of vitamin A (all trans-retinol, hereafter referred to as retinol), is a diffusible factor which acts as a paracrine signaling molecule throughout life in vertebrate organisms [1]. RA major mode of action consists in regulating the expression of responsive genes, which is mediated by interaction with specific nuclear receptors [2]. RA thus regulates numerous processes in embryonic development and morphogenesis, and in adults tissue homeostasis, cell proliferation, differentiation, and apoptosis [3-6]. RA has been used in the treatment and chemoprevention of certain cancers [7, 8]. Because of its pleiotropic effects, RA action must be tightly regulated at the spatial and temporal levels, through the coordinated action of biosynthetic and degrading enzymes [9].

RA biosynthesis from Vitamin A occurs in two oxidative steps. The first is the retinol to retinal (referring to all trans-retinal) reaction that is catalyzed by members of the medium chain or short chain dehydrogenase enzyme families. In the second step, retinal is irreversibly oxidized to RA by members of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily: ALDH1A1, ALDH1A2 and ALDH1A3, also known as retinal dehydrogenases RALDH1, RALDH2 and RALDH3, respectively [9-11]. In mammals' embryonic development, all three enzymes contribute to RA synthesis in a specific spatiotemporal pattern, although only RALDH2, which is expressed earliest, has been shown to be essential based on mouse gene knockout studies and is responsible for 80% RA synthesis in the embryo [12-14]. In the adult, RALDH1 is responsible for the major RALDH activity in rodent kidney and liver and is expressed in several epithelial tissues. RALDH1 has been involved in the catabolism of excess retinol, and has been linked to obesity [10, 12, 15]. RALDH2 is highly expressed in the adult testis [16] and has been proposed as a candidate tumor suppressor in prostate cancer [17]. Interestingly, RALDH2 expression is highly induced in regenerating tissues in zebrafish [18].

Tight control of retinoid metabolism is reflected in low *in vivo* concentrations of retinoids and particularly retinal, which production is rate-limiting *in vivo* [11, 15, 19, 20]. Furthermore, retinol, but also retinal to a lesser extent, are bound by the cellular retinol binding protein which thus limits the availability of free molecules for the metabolizing enzymes [21]. Therefore, this suggests the importance of efficient substrate molecular recognition of RALDH enzymes to ensure high affinity and specificity for retinal. The tridimensional structures of RALDH1 [22] and RALDH2 [23] have been reported as a complex

with the NAD cofactor, but in the absence of substrate. In the X-ray structure of RALDH1, the substrate binding site is shaped as a tunnel with a large entrance that can accommodate retinal [22]. Although the same secondary structure elements contribute to the substrate binding site, the loop that makes up the bottom wall of the tunnel is disordered in the X-ray structure of RALDH2 [23]. A disorder to order transition has been proposed to be linked to catalysis and to act as a mechanism conferring substrate specificity for retinal vs. short chain aldehydes [23, 24]. This hypothesis is consistent with the general notion that in ALDH enzymes, structural flexibility within the active site induced by ligand binding or associated with cofactor dynamics has been shown to be an integral component of catalysis [25-32].

This study addresses the molecular basis of retinal recognition in RALDH1 and RALDH2, through the comparison of the catalytic behavior of retinal analogs and use of the fluorescence properties of retinol. Our results provide for the first time direct evidence that retinal recognition involves at least two steps: first, the binding into the substrate access channel, and second, a structural reorganization that leads to the formation of a catalytically competent ternary complex, which would be rate-limiting for the overall reaction of retinal oxidation.

2. Material and Methods

2.1 Materials

NAD was purchased from Roche (Mannheim, Germany). Retinal, retinol, decanal, hexanal, citral, 2,4-decadienal (trans, trans isomer) and Hepes were sourced from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) was from Fluka (Sigma-Aldrich).

Retinoids are lipophilic compounds with low solubility in aqueous buffers [33]. Therefore, prior to enzymatic analysis, conditions were set up to increase the solubility of retinal and retinol, avoiding the use of micellar detergents such as Tween 80 that could affect enzyme kinetics by sequestering the substrate. Stock solutions of retinal and retinol were

Résultats : Partie 1

prepared in acetonitrile. Use of MPD as a solubilization agent at a concentration of 20 % allowed solubilization of retinal solutions up to 100 μM , while avoiding inhibitory effects on RALDH activity.

2.2 Site-directed mutagenesis, production and purification of wild type and mutated RALDHs

Mutant enzymes were generated by standard PCR site-directed mutagenesis.

Plasmid pET/RALDH(IIL) expressing a long form of RALDH2 including 11 N-terminal additional residues, was a generous gift from J.L. Napoli [16]. Recombinant *Rattus norvegicus* testis RALDH2 was produced from a pET14b-derived expression vector prepared by amplification with the *Pfu* polymerase and subcloning of the RALDH2 ORF encoding a 499-residue protein, between the *NdeI* and *BamHI* restriction sites, under the control of the T7 promoter. The construction was sequenced in order to confirm that no mutations had been introduced in the amplification reaction. This plasmid allowed production of N-terminal His-tagged RALDH2, hereafter referred to as RALDH2. *Escherichia coli* C41(DE3) transformants were grown at 37°C for 16 h in the ZYM5052 or N5052 autoinducible medium [34] supplemented with ampicillin (200 mg/L). For purification of wild-type and mutated RALDH2, cells were harvested by centrifugation, resuspended in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT and disrupted by sonication. The extract was clarified by centrifugation at 17000 g for 1 hour and dialyzed twice successively against 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 200 mM KCl and a 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 containing 1 M NaCl to remove small substrates that copurify with the protein. The supernatant was applied to a high performance nickel-Sepharose column previously equilibrated with the same buffer containing 50 mM imidazole, connected to an FPLC system (Amersham Biosciences). RALDH2 was eluted using at 0.5 M imidazole step. Enzyme concentration was determined spectrophotometrically by using molar absorption coefficient of $2.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm.

Recombinant human RALDH1 was produced from a pET20b-derived vector prepared by subcloning of the RALDH1 ORF amplified with the *Pfu* polymerase from the IRAUp969H0146D clone obtained from the IMAGE consortium, between the *NdeI* and *EcoRI*

restriction sites under the control of the T7 promoter. The resulting plasmid was sequenced in order to confirm that no mutations had been introduced in the amplification reaction. The RALDH1 protein was expressed in *Escherichia coli* C41(DE3) cells in the same conditions as described above. For purification of wild-type and mutated RALDH1, cells were harvested by centrifugation, resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 2 mM DTT and disrupted by sonication. The extract was clarified by centrifugation at 17000 g for 1 hour, and solid ammonium sulfate was added to 50% saturation. The precipitate was applied to a ACA34 gel filtration column, the fractions containing RALDH1 were then applied to anion exchange Q-Sepharose column connected to a FPLC system equilibrated with the same buffer, and RALDH1 was eluted using a 0 to 1 M KCl gradient. Final purification was achieved by hydrophobic chromatography on a phenyl-Sepharose column connected to a FPLC system equilibrated with potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 1 M ammonium sulfate, with elution by a decreasing 1 to 0 M ammonium sulfate gradient. Enzyme concentration was determined spectrophotometrically using a molar absorption coefficient of $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 280 nm. In the text, both RALDH1 and RALDH2 concentrations are expressed per monomer (normality, N).

2.3 Kinetic parameters for wild type and mutated RALDHs under steady-state conditions

For non-retinal substrates, initial rate measurements were carried out at 25°C on a SAFAS UV mc2 spectrophotometer, by following the appearance of NADH at 340 nm in 20 mM Hepes pH 8.5 buffer containing 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% MPD (standard buffer). The initial rate data were fit to the Michaelis–Menten equation using non linear least-squares regression analysis to determine the k_{cat} and K_{M} values. For RALDH1 in the presence of retinal, the reaction was followed at 340 nm as the overall combination of increasing absorbance of produced NADH and RA and decreasing contribution of retinal absorbance, experimentally determined as $31000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in these conditions. All K_{M} values were determined at saturating concentrations of NAD. For RALDH2 with retinal, due to low K_{M} value, the reaction was monitored by NADH fluorescence, more sensitive than absorbance, using a rapid-mixing SX18MV-R stopped-flow apparatus.

Résultats : Partie 1

2.4 Pre-steady-state kinetic measurements

Pre-steady-state kinetic analyses were carried out on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) and collected data were analyzed using the SX18MV-R software package. To study the acylation step, progress curves of NADH production were recorded at 25 °C in standard buffer by following fluorescence emission using a 395 nm cutoff filter after excitation at 350 nm. One syringe was filled with 2 μN RALDH and 2 mM NAD and the other contained 2 mM NAD and the substrate (final concentrations after mixing). To study retinol interaction with RALDHs, fluorescence emission filtered above 455 nm was monitored after excitation at 295 nm at 25 °C in standard buffer. One syringe was filled with 2 μN RALDH and the other contained 30 μM retinol in the presence or absence of 2 mM NAD (final concentrations after mixing). Progress curves were fit according to a biphasic expression.

2.5 Fluorescence and fluorescence anisotropy binding assay

Fluorescence spectra and anisotropy measurements were carried out on a spectrofluorimeter SAFAS Flx-Xenius equipped with dual monochromators. RALDH1 dissociation constants for retinol were deduced from anisotropy titrations of 10 μM retinol in standard buffer at 25°C with increasing RALDH1 concentrations recorded at 325 nm excitation and 482 nm emission wavelengths using 10 nm slits. The instrument computed anisotropy from samples illuminated with vertically polarized light $A = (I_{VV} - G.I_{VH}) / (I_{VV} + 2G.I_{VH})$ where I_{VV} is the fluorescence intensity recorded with excitation and emission polarization in vertical position, and I_{VH} is the fluorescence intensity recorded with the emission polarization aligned in horizontal position. The G-factor of the spectrofluorometer represents the ratio of the sensitivities of the detection system for vertically and horizontally polarized light and was calculated by the instrument for each individual sample. Data obtained were expressed as the fraction of complex formed $(A - A_0)/(A_{max} - A_0)$, where A_0 and A_{max} represent the anisotropy of free and bound retinol, vs. the concentration of RALDH1. Data sets were fit to a single-site binding model.

3. Results and discussion

3.1 The chemical structure of long-chain aldehyde substrates determines the rate-limiting step of RALDH1 and RALDH2

Previous structural and enzymatic studies on mouse RALDH2 using model substrates with saturated linear aliphatic chain suggested a role of a disorder to order transition within the substrate access channel for long-chain aldehyde selectivity [24]. Assuming this hypothesis, we surmised that the conformational flexibility of the substrate should impact catalysis. Therefore, the steady-state and presteady state kinetics of RALDH2 were analyzed using retinal and its unsaturated analogs citral and 2,4-decadienal, and compared to those obtained with the saturated analogs decanal and hexanal (Fig. 1, Table 1). For all substrates, RALDH2 followed classical Michaelis-Menten kinetics with Michaelis constants values ranging from 2 to 6.4 μM for all substrates but hexanal, characterized by a 23 μM K_M , all of which were consistent with values previously reported in studies from other groups [16, 24, 35]. Regarding the catalytic constant however, significantly higher values were measured compared to most older reports, which could be related to enzyme purification protocol or to experimental conditions of enzyme activity determinations. In these conditions, oxidation of citral was found to be catalyzed by RALDH2, unlike formerly described [16]. Citral is a mixture of cis and trans isomers of 3,7-dimethyl 2,6-octadienal (neral and geranial, respectively), of which geranial bears closer structural similarity to retinal and is a better substrate as neral [36].

The characteristic feature revealed by this kinetic profile was the distinct behavior of RALDH2 with decanal or hexanal, which were oxidized with k_{cat} of $\sim 2 \text{ s}^{-1}$, 13 to 22-times higher compared to the corresponding values for retinal, 2,4-decadienal or citral. Similar trend was observed for RALDH1 which metabolized decanal and retinal with 1.0 and 0.07 s^{-1} k_{cat} values, respectively (Table 1). Such differences could be correlated with a distinct rate-limiting step in the catalytic cycle. This hypothesis was thus tested by following the kinetics of the reaction in presteady state conditions using the fluorescence signal of the NADH produced, which are shown in Fig. 2 for RALDH2 with decanal, retinal, citral and 2,4-decadienal. When decanal was used as substrate, an exponential burst of NADH production

Résultats : Partie 1

was observed, corresponding to the first cycle of decanal oxidation and characterized by a rate constant of 36 s^{-1} , 16-times higher than the k_{cat} value, followed by a slower, linear phase corresponding to steady state NADH release. Such behavior shows that the rate-limiting step occurs after the hydride transfer. On the contrary, no significant burst was observed compared to the control recorded in the absence of substrate when the unsaturated substrates retinal, citral and 2,4-decadienal were used, revealing that in these cases, the rate-limiting step corresponded to a process occurring within the acylation step. Likewise, the rate-limiting step of retinal and decanal oxidation by RALDH1 was observed to correspond to acylation and deacylation, respectively (data not shown). Therefore, these results suggest a correlation between the saturated/unsaturated chemical structure of the substrate, including the associated physicochemical characteristics such as conformational flexibility, and the rate-limiting event of the catalytic cycle.

3.2 Probing the molecular mechanism of substrate recognition by FRET using the fluorescent analog retinol

Within acylation, the rate-limiting process can be associated with molecular recognition events including binding or conformational reorganization, to the nucleophilic attack of the catalytic Cys on the carbonyl group of the substrate, or to the hydride transfer. To probe substrate recognition to the RALDHs, we searched for the existence of a FRET signal between the Trp residues of the RALDHs and retinol, a fluorescent analog close to retinal that is likely to bind to RALDHs in a similar manner. Indeed, the fluorescence emission maximum wavelength of Trp at $\sim 330 \text{ nm}$ matches the absorption maximum wavelength of retinol at 325 nm , which makes possible fluorescence energy transfer from Trp to a retinol molecule bound to the enzyme. In addition, retinol is not a substrate for RALDHs, which allows characterizing a ternary complex with NAD (see below). As shown in Fig. 3, addition of excess retinol resulted in significant quenching of Trp emission on the spectrum of RALDH1 and RALDH2 after excitation at 295 nm , while a new emission band showed up at wavelengths superior to 400 nm . Due to the existence of a shoulder in this region of the spectrum of RALDH1 in the absence of retinol, this band was better analyzed from the difference spectra recorded after and before addition of retinol, as shown is the inset of Fig. 3. In the case of RALDH2, the

difference spectrum reveals an envelope very similar to the retinol emission spectrum with a maximum intensity at 483 nm, thereby indicating Trp to retinol FRET. In the case of RALDH1, the signal was characterized by a lower intensity and a blue-shift of 15 nm, suggesting that retinol is bound in a physicochemical environment different from RALDH2.

RALDH2 contains six Trp residues per monomer also found in RALDH1, among which Trp177 is of particular interest due to its location within the substrate access channel defined in the X-ray structures (Fig. 4) [22, 23]. Therefore, the contribution of Trp177 to the FRET signal was tested by comparing the effect of retinol on the Trp fluorescence spectrum of wild-type and W177F RALDH2. In the mutant, the intensity of the FRET signal at 383 nm was depressed by at least 80%, showing the major contribution of Trp177 to the fluorescence transfer. This suggests that retinol binds in the close environment of Trp177, thus validating the specificity of this probe for the study of retinol binding in these enzymes.

To analyze the mechanism of retinol recognition, the FRET property of retinol within the complex formed with RALDHs was used as a probe to monitor the kinetics of retinol binding interactions in a rapid kinetics apparatus. The progress curve for the FRET signal, recorded after rapid mixing of 2 μ N RALDH2 monomers and 30 μ M retinol (Fig. 5, trace 1), is best described by a combination of two exponential phases characterized by rate constants of 6.2 and 0.35 s^{-1} , the amplitude of the slower phase representing 82 % of the total amplitude. Similar behavior was found for RALDH1, although the rapid and slow phases were characterized by rate constants of 0.82 and 0.16 s^{-1} , respectively, and the amplitude of the slower phase represented 22 % of the total amplitude (Fig. 5, trace 2). As expected from the intensity of the FRET band in the spectra (Fig. 3), the total amplitude of the progress curves was lower for RALDH1 than for RALDH2. Because the competent Michaelis species for the catalysis of retinal oxidation is a ternary complex with NAD, the interaction of retinol with the RALDHs was also recorded in the presence of NAD (Fig. 5, traces 2 and 4). Apart from a significant effect on the total amplitude due to the screening effect due to NAD absorption at the excitation wavelength 295 nm, very similar results were obtained in the presence of 2 mM NAD, with e.g. for the slower phase, rate constants of 0.25 and 0.18 s^{-1} , and amplitudes of 85 and 28 % of the total, for RALDH2 and RALDH1, respectively. Therefore, although the kinetic mechanism of several non-CoA dependent ALDHs was described to be ordered sequential [37,

38], retinol is able to bind the apo-RALDHs with similar kinetics as the RALDH-NAD binary complex when probed by the retinol FRET signal.

The biphasic nature of the kinetics of interaction of retinol, suggests that after entrance into the substrate access channel, which could correspond to the fast phase, a conformational transition of the complex occurs that results in a modification of the distance and/or orientation between the retinol and Trp177 fluorophores and to the signal observed in the second, slower phase. This interpretation is supported by the fact that the rate of the fast phase increases with retinol concentration (data not shown), while the rate of the slower phase remains unchanged. Because retinol and retinal bear very close structures, the same mechanism could likely also hold for retinal recognition. Such results could be directly correlated to the disorder to order transition of the region comprising residues 462-478 proposed to provide substrate specificity to RALDH2, based on the X-ray structure of the enzyme/NAD complex [23]. In the case of RALDH1 however, the X-ray structure revealed an ordered substrate access channel. This does not preclude the occurrence of a conformational transition, although it could in part explain the lower relative magnitude of the corresponding kinetic step in the progress curve recorded by the FRET signal (28% vs. 85% for RALDH2).

Furthermore, when compared to the kinetics of retinal oxidation, the rate constants of the slower phase of retinol interaction with the enzymes appear of the same magnitude as the k_{cat} (0.18 vs. 0.07 s⁻¹ and 0.25 vs. 0.1 s⁻¹ for RALDH1 and RALDH2, respectively). This suggests that the conformational transition of the RALDH-retinal complex proposed above significantly contribute to the rate-limiting step that controls the kinetics of retinal oxidation. By extension, the rate-limiting process of citral and 2,4-decadienal oxidation, that is shown to be associated with acylation, would also be controlled by a structural reorganization concomitant to substrate molecular recognition. Retinal, citral and 2,4-decadienal share a common unsaturated structure of the carbon chain which imparts these molecules lower flexibility than the saturated substrates such as decanal or hexanal (Fig. 1). This therefore suggests that the formation of a Michaelis complex RALDH/NAD/substrate competent for the subsequent chemical steps of acylation requires a conformational adaptation of the substrate access channel in the case of the retinal/citral/2,4-decadienal substrates. Noticeably, the β -ionone ring of retinal seems not to play a critical role for substrate efficient recognition, in agreement

with the results of retinal docking on the RALDH1 structure, showing that the ring sticks out from the tunnel entrance and is partially exposed to solvent in this model [22]. By contrast, the efficient binding of saturated substrates would be promoted by their intrinsic flexibility, making this process not rate-limiting for the overall reaction.

3.3 Mutations in RALDH1 substrate binding site affect the conformational transition that conveys substrate recognition in RALDH1

In the known X-ray structures of RALDH1 and RALDH2, the substrate access channel is built up by residues from three helices and a loop (455-461). As mentioned above, this loop appears disordered in the structure of RALDH2, while it is well-defined in the structure of RALDH1 [22, 23]. In an attempt to identify structural determinants of retinal recognition, we selected residue positions in RALDH1, also defined in the RALDH2 structure, that line the entrance of the tunnel and could thus participate in the motions occurring with retinal recognition when the competent catalytic complex forms (Fig. 4). In RALDH1, residues Asn120 (Ile/Val in RALDH2), Lys127 (conserved in RALDH2) and Tyr296 (Phe in RALDH2), were substituted by Ala, Ala and Ala/Val, respectively, and the binding affinity of the mutant enzymes for retinol was determined by fluorescence anisotropy and compared with the catalytic parameters for retinal oxidation. Fluorescence anisotropy allows the monitoring of complex formation between retinol and the protein, irrespective of the conformational state of the complex. Determination of the affinity constants K_D by this method shows that the mutations had little effect on the overall affinity of RALDH1 for retinol, which likely also applies for retinal. However, although only slight effect is observed on the steady state kinetic parameters for the N120A and K127A mutants, the k_{cat} for retinal oxidation catalyzed by the Y296A and Y296V RALDH1s is lowered 4 and 8-times compared to the wild type. If the rate-limiting step of retinal oxidation by RALDH1 is associated with the structural reorganization occurring upon the formation of the competent catalytic complex, this result suggests that position 296 participates in this process either directly or indirectly.

3.4 Conclusion

Structural dynamics within the active site are essential components of the catalytic cycle of ALDH enzymes. In this study, direct evidence supports the role of a conformational transition in the molecular recognition and specificity of RALDH1 and RALDH2 for retinal. This step would be a prerequisite for the formation of a catalytically competent complex and could thus control the process of RA synthesis from low *in vivo* levels of retinal. The approaches developed herein, including use of the fluorescent analog retinol, will allow in the future to probe for this critical step in RA biosynthesis and understand the role of structural elements within the active site of RALDH enzymes in retinal recognition.

Acknowledgements

We thank J.L. Napoli for his generous gift of the RALDH2 clone. We gratefully acknowledge S. Boutserin for very efficient technical help and Dr A. Gruez for helpful discussions. R. B. was supported by the French Research Ministry. This work was supported in part by the Association pour la Recherche contre le Cancer, the CNRS, the University of Nancy I, local funds from the Région Lorraine and also the National Institutes of Health grants EY17963 and EY11490.

References

- [1] G. Duyster, Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis, *Cell* 134 (2008) 921-931.
- [2] M. Mark, N.B. Ghyselinck, P. Chambon, Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46 (2006) 451-480.
- [3] L.J. Gudas, Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 213-221.
- [4] M. Maden, Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous

- system, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 755-765.
- [5] N. Noy, Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis, *Annu. Rev. Nutr.* 30 (2010) 201-217.
- [6] D.R. Soprano, B.W. Teets, K.J. Soprano, Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells, *Vitam. Horm.* 75 (2007) 69-95.
- [7] L. Altucci, H. Gronemeyer, The promise of retinoids to fight against cancer, *Nat. Rev. Cancer* 1 (2001) 181-193.
- [8] R.M. Niles, Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer, *Mutat. Res.* 555 (2004) 81-96.
- [9] G. Duester, F.A. Mic, A. Molotkov, Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid, *Chem. Biol. Interact.* 143-144 (2003) 201-210.
- [10] S.A. Marchitti, C. Brocker, D. Stagos, V. Vasiliou, Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily, *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 697-720.
- [11] X. Pares, J. Farres, N. Kedishvili, G. Duester, Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism, *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3936-3949.
- [12] S. Kumar, L.L. Sandell, P.A. Trainor, F. Koentgen, G. Duester, Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 198-205.
- [13] F.A. Mic, R.J. Haselbeck, A.E. Cuenca, G. Duester, Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of *Raldh2* null mutant mice, *Development* 129 (2002) 2271-2282.
- [14] K. Niederreither, V. Subbarayan, P. Dolle, P. Chambon, Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development, *Nat. Genet.* 21 (1999) 444-448.
- [15] J.L. Napoli, Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 152-167.
- [16] X. Wang, P. Penzes, J.L. Napoli, Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 16288-16293.

Résultats : Partie 1

- [17] H. Kim, J. Lapointe, G. Kaygusuz, D.E. Ong, C. Li, M. van de Rijn, J.D. Brooks, J.R. Pollack, The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 8118-8124.
- [18] L.K. Mathew, S. Sengupta, J.A. Franzosa, J. Perry, J. La Du, E.A. Andreasen, R.L. Tanguay, Comparative expression profiling reveals an essential role for raldh2 in epimorphic regeneration, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33642-33653.
- [19] J.L. Napoli, Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of retinoic acid synthesis by an established mammalian cell line, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13592-13597.
- [20] C. Wang, M.A. Kane, J.L. Napoli, Multiple retinol and retinal dehydrogenases catalyze all-trans-retinoic acid biosynthesis in astrocytes, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 6542-6553.
- [21] G. Malpeli, M. Stoppini, M.C. Zapponi, C. Folli, R. Berni, Interactions with retinol and retinoids of bovine cellular retinol-binding protein, *Eur. J. Biochem.* 229 (1995) 486-493.
- [22] S.A. Moore, H.M. Baker, T.J. Blythe, K.E. Kitson, T.M. Kitson, E.N. Baker, Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases, *Structure* 6 (1998) 1541-1551.
- [23] A.L. Lamb, M.E. Newcomer, The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity, *Biochemistry* 38 (1999) 6003-6011.
- [24] T. Bordelon, S.K. Montegudo, S. Pakhomova, M.L. Oldham, M.E. Newcomer, A disorder to order transition accompanies catalysis in retinaldehyde dehydrogenase type II, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 43085-43091.
- [25] R. Bchini, H. Dubourg-Gerecke, S. Rahuel-Clermont, A. Aubry, G. Branlant, C. Didierjean, F. Talfournier, Adenine binding mode is a key factor in triggering the early release of NADH in CoA-dependent methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* (2012).
- [26] K. D'Ambrosio, A. Pailot, F. Talfournier, C. Didierjean, E. Benedetti, A. Aubry, G. Branlant, C. Corbier, The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis, *Biochemistry* 45 (2006) 2978-2986.
- [27] P.K. Hammen, A. Allali-Hassani, K. Hallenga, T.D. Hurley, H. Weiner, Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 41 (2002) 7156-7168.
- [28] S. Marchal, G. Branlant, Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor

- binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 38 (1999) 12950-12958.
- [29] R.A. Munoz-Clares, L. Gonzalez-Segura, A.G. Diaz-Sanchez, Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction, *Chem. Biol. Interact.* 191 (2011) 137-146.
- [30] S.J. Perez-Miller, T.D. Hurley, Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 42 (2003) 7100-7109.
- [31] S. Rahuel-Clermont, D. Arutyunov, S. Marchal, V. Orlov, V. Muronetz, G. Branlant, Thermal destabilization of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* upon phosphate binding in the active site, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 18590-18597.
- [32] F. Talfournier, A. Pailot, C. Stines-Chaumeil, G. Branlant, Stabilization and conformational isomerization of the cofactor during the catalysis in hydrolytic ALDHs, *Chem. Biol. Interact.* 178 (2009) 79-83.
- [33] E.Z. Szuts, F.I. Harosi, Solubility of retinoids in water, *Arch. Biochem. Biophys.* 287 (1991) 297-304.
- [34] F.W. Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein. Expr. Purif.* 41 (2005) 207-234.
- [35] I. Gagnon, G. Duester, P.V. Bhat, Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates, *Biochim. Biophys. Acta* 1596 (2002) 156-162.
- [36] A. Kikonyogo, D.P. Abriola, M. Dryjanski, R. Pietruszko, Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist, *Eur J Biochem* 262 (1999) 704-712.
- [37] A.K. MacGibbon, L.F. Blackwell, P.D. Buckley, Kinetics of sheep-liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 77 (1977) 93-100.
- [38] S. Marchal, S. Rahuel-Clermont, G. Branlant, Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 39 (2000) 3327-3335.

Figure captions

Figure 1. Chemical structures of retinal, retinol and the aldehyde analogs used in this study.

Figure 2. Presteady state kinetics of NADH production for the reaction catalyzed by RALDH2 with retinal and aldehyde analogs: decanal 100 μ M (1), retinal 5 μ M (2), citral 100 μ M (3), 2,4-decadienal 100 μ M (4), control in absence of substrate (5). A solution of 1 μ N RALDH2, 2 mM NAD is rapidly mixed at 25°C with an equal volume of 2 mM NAD and substrate in Hepes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MPD 20%, pH 8.5 buffer. Following excitation at 350 nm, the fluorescence signal of NADH is monitored using a 395 nm cutoff filter.

Figure 3. Fluorescence emission spectra of RALDHs in the absence and presence of retinol. The excitation wavelength is set at 295 nm corresponding to Trp fluorescence excitation and the spectra recorded for 10 μ M enzyme in the absence (black traces) and presence (gray traces) of 10 μ M retinol in Hepes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MPD 20%, pH 8,5 buffer. For each enzyme spectra in absence and presence of retinol are recorded in the same conditions. Spectra for RALDH1 (solid), RALDH2 (dash) and RALDH2 W177F (dots) are normalized according to the maximum fluorescence intensity of the apo enzyme. Inset: difference spectra of the effect of retinol addition in the 400-550 nm region, compared with the emission spectrum of retinol (solid).

Figure 4. View of the substrate access channel of sheep liver RALDH1 (coordinates from the pdb entry 1bxs). The large entrance is lined with Tyr-296 (blue), Met-120 (green), Lys-127 (cyan) and a loop makes up the bottom wall of the channel. The positions of Trp-177 (orange), of the catalytic Cys-302 (yellow) and of the nicotinamide moiety of the NAD cofactor are shown deeper in the tunnel. The figure was prepared using Pymol 0.99 (www.pymol.org).

Figure 5. Kinetics of interaction of retinol with RALDHs monitored by FRET. Times courses

are recorded after mixing of 2 μ N RALDH2 (1,2) or RALDH1 (3,4) with 30 μ M retinol in the absence (1,3) or presence of 2 mM NAD (2,4), in Hepes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MPD 20%, pH 8,5 buffer at 25°C. Following excitation at 295 nm, the fluorescence signal is monitored using a 455 nm cutoff filter. The collected data were fit to according to a biphasic expression.

Table 1

Steady state kinetics parameters of wild-type RALDHs with retinal and analogs.

Substrate	RALDH2		RALDH1	
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
Retinal	2.0 ^b	0.10	8.1	0.07
2,4 decadienal	6.3	0.15	ND	ND
Citral	2.9	0.10	ND	ND
Decanal	6.4	2.2	10.0	1.0
Hexanal	23.0	2.0	ND	ND

^a Kinetic parameters were deduced from non-linear regression of experimental data sets, according to the Michaelis-Menten equation. All K_M values were determined at saturating concentrations of the NAD cofactor. The steady-state initial rates of the reaction of both RALDHs were measured at 25°C in 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 20%MPD, pH 8.5 buffer, by following NADH absorbance or the resulting absorbance of retinal, RA and NADH. The standard deviation is below 20%. ND, not determined.

^b Measured by monitoring NADH fluorescence on a stopped flow apparatus.

Table 2

Steady state kinetics parameters of wild-type and mutant RALDH1 with retinal compared with dissociation constants for retinol

RALDH1	Retinal ^a		Retinol ^b
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_D (μM)
WT	8,1	0,07	1,8
N120A	11,3	0,03	3,1
K127A	8,6	0,03	3,7
Y296A	8,9	0,017	1,7
Y296V	15,3	0,008	2,6

^a Kinetic parameters were determined as in Table 1.

^b Determined by monitoring retinol fluorescence anisotropy recorded at 325 nm excitation and 482 nm emission wavelengths. Data sets obtained at 10 μM retinol by varying RALDH1 concentration in 20 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 20%MPD, pH 8.5 buffer at 25°C, were fit to a single-site, saturable binding model. The standard deviation is below 20%.

Résultats : Partie 1

Figure 1

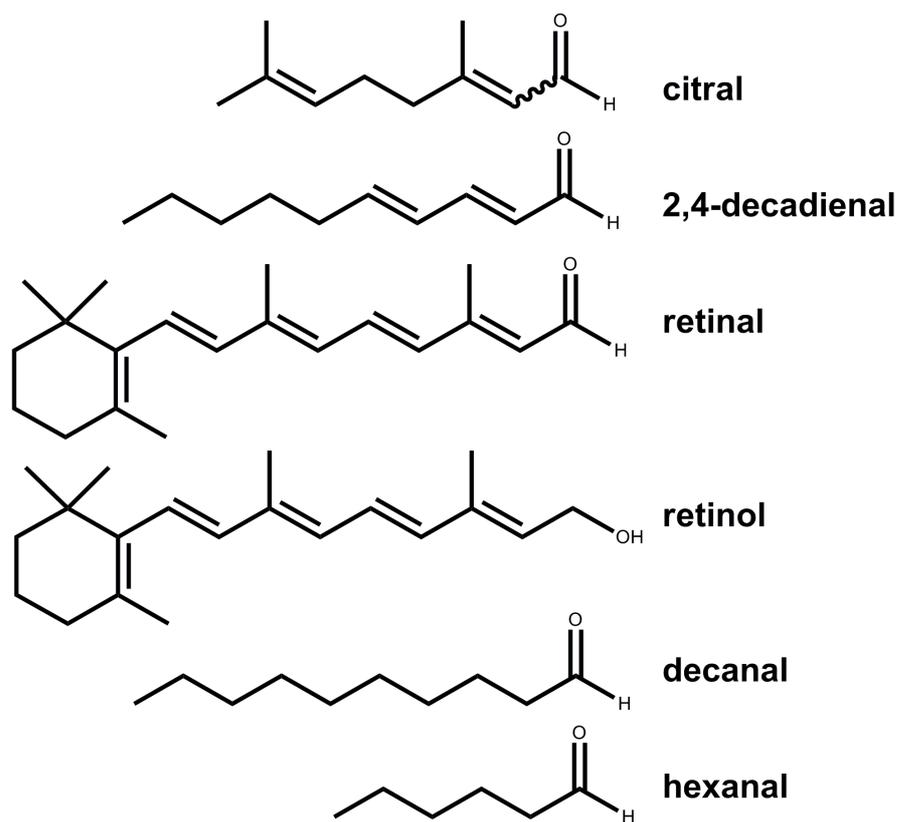


Figure 2

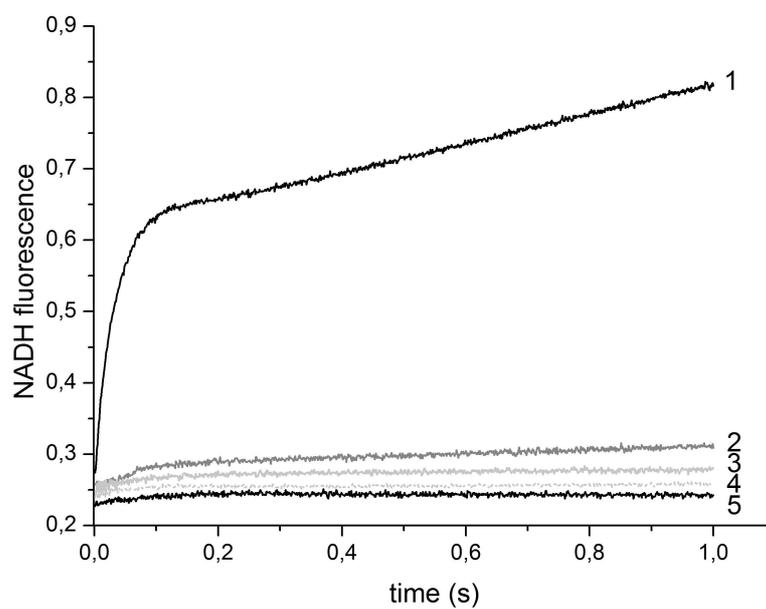


Figure 3

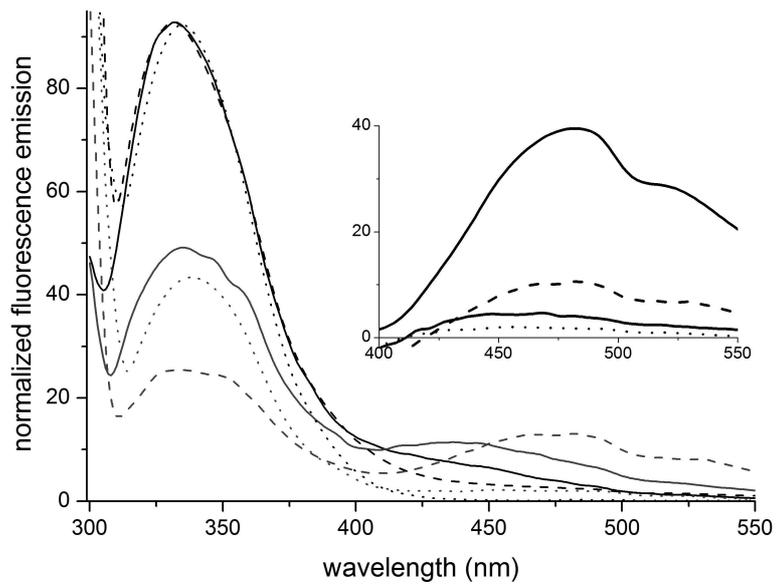


Figure 4

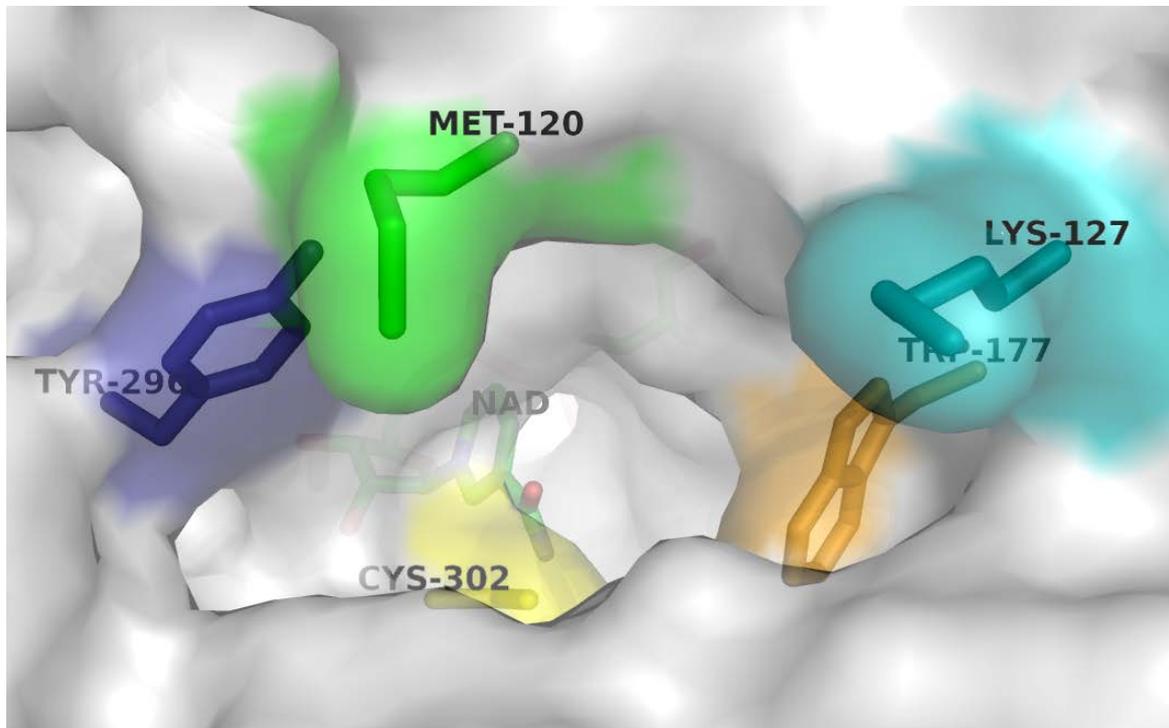
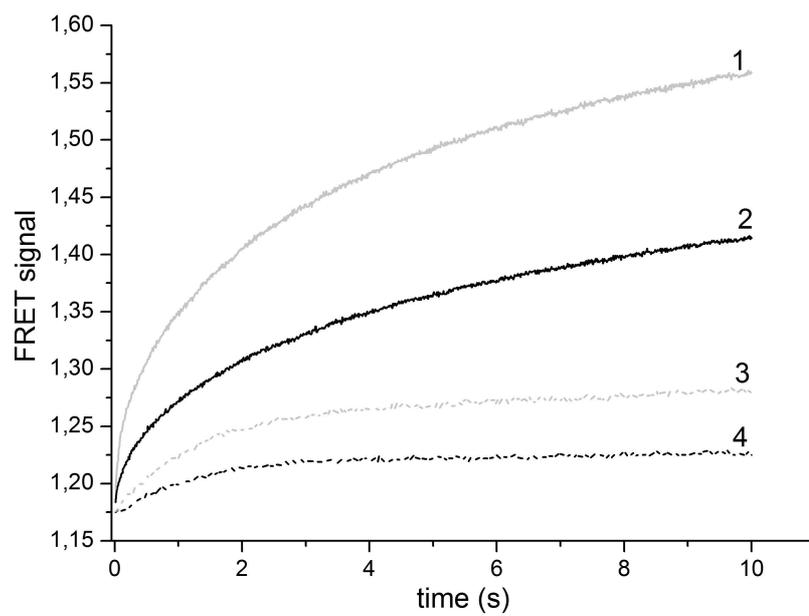


Figure 5



Résultats
PARTIE 2

Caractérisation de la dynamique du processus d'isomérisation conformationnelle du cofacteur réduit au cours de la catalyse

1. Stratégie : les propriétés de fluorescence du NADH constituent une sonde conformationnelle

L'étude de la dynamique d'un processus conformationnel participant au cycle catalytique requiert l'utilisation d'un signal spécifique, couplé à une méthode cinétique permettant son analyse en temps réel. Dans le cas du basculement de la partie NMNH du cofacteur réduit au cours du cycle catalytique des ALDH, les propriétés de fluorescence du NMNH pouvaient constituer une sonde spectroscopique sensible aux variations d'environnement moléculaire lors du changement de conformation se produisant entre les étapes d'acylation et de désacylation.

1.1. Propriétés de fluorescence du NADH au sein d'un complexe binaire avec la RALDH2

Cette hypothèse a été testée en premier lieu par l'étude de l'effet de la formation d'un complexe binaire avec l'enzyme sur le spectre d'émission de fluorescence du NADH, obtenu par excitation de la bande d'absorption spécifique du NMNH à 350 nm. L'émission de fluorescence du NADH, maximale à 454 nm, subit un léger décalage de 10 nm vers 442 nm, et une augmentation importante d'intensité d'un facteur au moins 2,5 sous l'effet de l'interaction avec la RALDH2 (figure 29). Le signal de fluorescence du NADH, s'il s'avérait sensible aux modifications de conformation du NADH au cours du cycle catalytique, pouvait donc potentiellement servir de sonde pour suivre ce phénomène.

Résultats : Partie 2

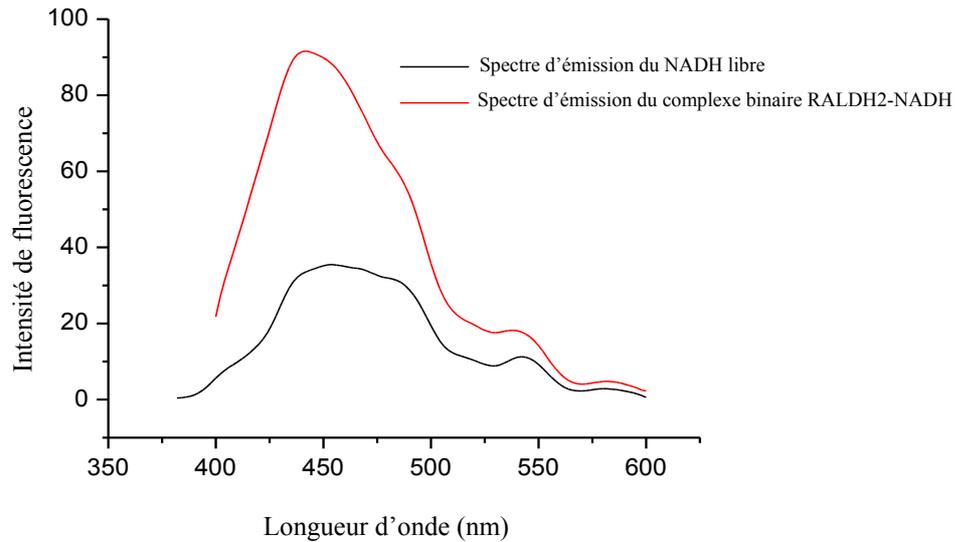


Figure 29 : Spectres d'émission du NADH sous forme libre et sous forme de complexe binaire RALDH2-NADH.

Les spectres d'émission du NADH libre (courbe noire) et sous forme de complexe binaire RALDH2-NADH (courbe rouge), ont été enregistrés après excitation à 350 nm.

Les mesures sont effectuées dans du tampon Hépès 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 80 0,05 %, pH 8,5) à 25 °C. Le photomultiplicateur est réglé à 500 V.

En outre, sous forme de complexe binaire avec le NADH, certaines ALDH hydrolytiques eucaryotes comme la RALDH2 de rat présentent également un phénomène de FRET entre un ou plusieurs résidus tryptophane de l'enzyme et le NADH (figure 30). En effet, les spectres d'excitation du NADH (longueur d'onde maximale d'excitation λ_{\max} de 350 nm) et d'émission des résidus tryptophane (λ_{\max} d'émission d'environ 330 nm) se recouvrent largement, ce qui rend possible un transfert de fluorescence entre ces deux partenaires (figure 30 A). Ce phénomène de FRET est caractérisé par une diminution de l'intensité du signal d'émission de fluorescence des résidus tryptophanes liée à une augmentation de l'intensité du signal d'émission du NADH à 450 nm (figure 30 B). Le fait que l'intensité du FRET dépende de l'orientation des deux fluorophores, le résidu tryptophane et le cycle NMNH du cofacteur réduit, a suggéré l'utilisation de cette propriété comme sonde spectroscopique pour caractériser l'isomérisation du cofacteur au cours du cycle catalytique dans les ALDH non phosphorylantes.

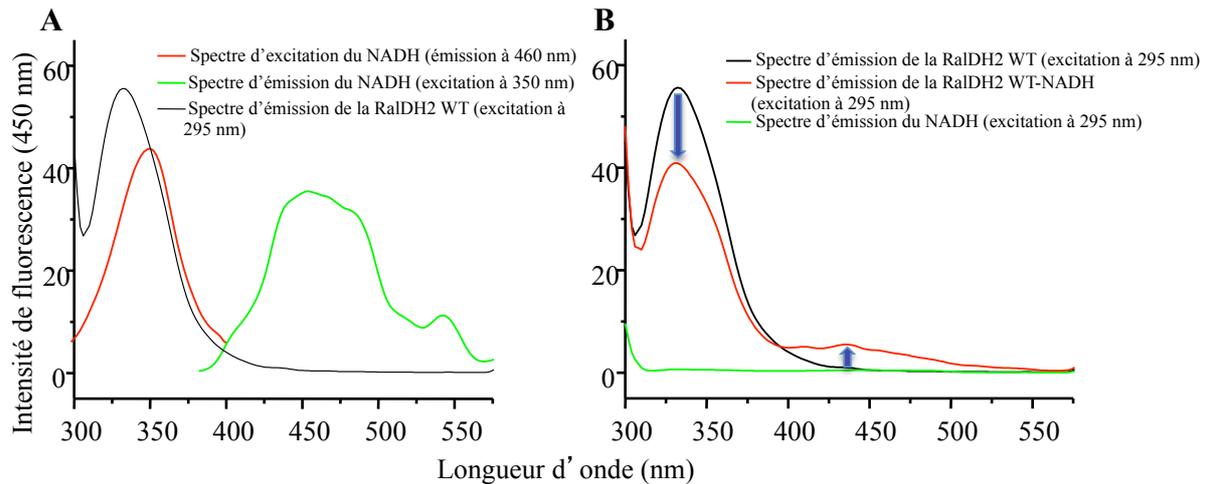


Figure 30 : Spectres d'émission de fluorescence du NADH et de la RALDH2 sous forme apoenzyme et sous forme de complexe binaire RALDH2-NADH

Les mesures sont effectuées dans du tampon Hépès 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 80 0,05 %, pH 8,5) à 25 °C. le photomultiplicateur est réglé à 500 V.

A : Spectres d'excitation (émission à 460 nm) et d'émission (excitation à 350 nm) du NADH, superposés au spectre d'émission de la RALDH2 de type sauvage (excitation à 295 nm). Les spectres d'excitation et d'émission du NADH sont représentés respectivement en rouge et en vert. Le spectre d'émission de la forme apoenzyme de la RALDH2 de type sauvage dont les résidus tryptophane ont été excités à 295 nm est représenté en noir.

B : Caractérisation du phénomène de FRET dans la RALDH2. A titre de contrôle, les spectres d'émission de la RALDH2 de type sauvage et du NADH après excitation à 295 nm sont représentés en noir et vert. Le spectre d'émission du complexe binaire RALDH2-NADH après excitation à 295 nm est représenté en rouge.

1.2. Propriétés enzymatiques de la RALDH2 avec l'analogue de substrat décanal

Les propriétés cinétiques de la RALDH2 ont été analysées à l'état stationnaire avec comme substrat un analogue du substrat naturel de l'enzyme, le décanal. En effet, du point de vue cinétique, les étapes de production et de basculement du NADH se produisent avant l'étape de désacylation. Ces étapes ne peuvent donc être observées qu'à condition que l'étape limitante de la réaction soit associée à la désacylation, et doivent être suivies dans des conditions préstationnaires permettant de suivre le premier cycle catalytique de l'enzyme après le déclenchement de la réaction (conditions de « single turnover »). Dans le cas de la RALDH2, la nature de l'étape cinétiquement limitante dépend du substrat utilisé, l'étape lente étant associée à l'acylation ou à la désacylation en présence respectivement de rétinol ou de décanal. Le décanal a donc été utilisé comme substrat dans cette étude.

Dans ces conditions, des études préliminaires à l'état préstationnaire ont permis de montrer que l'oxydation du décanal par la RALDH2 pouvait être suivie non seulement par le signal de fluorescence du NADH (excitation à 350 nm) mais aussi par le signal de FRET (excitation à 295 nm) (figure 31) :

Résultats : Partie 2

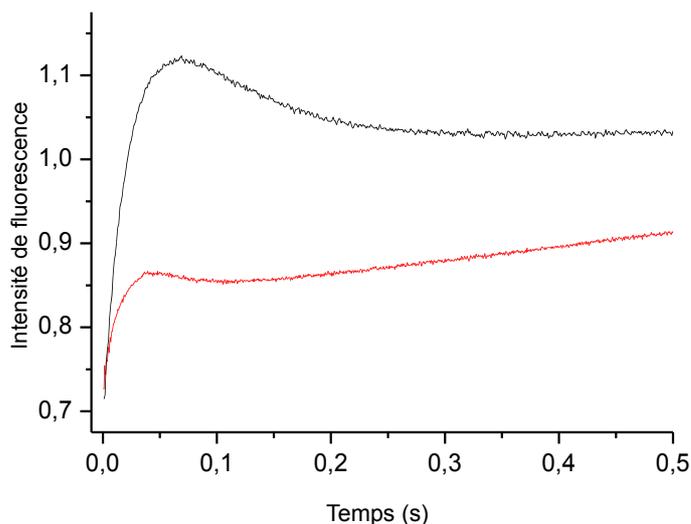


Figure 31 : Etude à l'état préstationnaire de la réaction catalysée par la RALDH2 de type sauvage.

Les mesures sont effectuées dans le tampon d'activité (Hépes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 80 0,05 %, pH 8,5) à 25°C, à une concentration de 1 μ N d'enzyme. La concentration de NAD et de décanal sont fixées à 2 mM et 50 μ M respectivement. Le photomultiplicateur est réglé à 400 V. La cinétique d'apparition du NADH au cours du temps est représentée en rouge. Le NADH est excité spécifiquement à 350 nm. La courbe permettant de visualiser les phénomènes de FRET pour la RALDH2 est représentée en noir. Les résidus tryptophane de l'enzyme sont excités spécifiquement à 295 nm. Dans les deux cas, un filtre permet de détecter le signal de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à 395 nm.

La production de NADH est suivie *via* le signal d'émission de fluorescence en utilisant un filtre permettant de visualiser les signaux de fluorescence dont la longueur d'onde est supérieure à 395 nm après excitation à 350 nm (courbe rouge). Les vitesses étant rapides, elles ont été mesurées avec un appareil cinétique à mélange rapide (stopped-flow). Dans le cas de la RALDH2 de type sauvage, la cinétique d'évolution de l'émission de fluorescence du NADH est caractérisée par une combinaison de deux phases exponentielles et d'une phase linéaire. La première phase exponentielle croissante correspond à la production du NADH et donc à la cinétique de l'étape d'acylation. Le signal suivi au cours de cette phase correspondrait donc à celui du NADH dans sa conformation compatible avec le processus de transfert d'hydrure, au sein du complexe ternaire thioacylenzyme/NADH. La phase la plus lente, linéaire, correspond à l'état stationnaire de la réaction et donc à la cinétique de l'étape de désacylation qui limite la vitesse globale de la réaction. Le signal suivi au cours de cette phase correspondrait donc à celui du NADH libre après dissociation de l'enzyme. Enfin, la réaction catalysée par la RALDH2 est caractérisée par une seconde phase exponentielle décroissante, qui suit la première phase associée à l'acylation, et qui correspondrait à un

processus au cours duquel l'intensité du signal de fluorescence du NADH est modifiée. Ceci implique une variation du rendement quantique et/ou de l'effet d'écran sur la fluorescence du NADH, nécessairement associés à des changements dans l'environnement du fluorophore. Ce signal pourrait donc correspondre à l'étape d'isomérisation de la partie NMNH du NADH qui se produit obligatoirement après le transfert d'hydrure. Ce changement conformationnel conduirait au passage du NMNH d'un environnement hydrophobe à un environnement plus exposé au solvant, en cohérence avec la diminution du signal de fluorescence et avec l'analyse de la structure du complexe cristallin GAPN thioacylenzyme/NADPH (D'Ambrosio *et al.*, 2006).

Le signal de FRET a été suivi pour les mêmes réactions aux longueurs d'onde supérieures à 395 nm après excitation à 295 nm, dans le but de détecter un transfert de fluorescence entre un ou plusieurs résidus tryptophane de l'enzyme et le NADH produit dans le site actif au sein du complexe ternaire thioacylenzyme/NADH. Le profil cinétique obtenu est similaire à celui décrit en fluorescence directe du NADH, avec cependant des différences marquées au niveau des amplitudes relatives des trois phases. La pente de la phase linéaire, qui correspond au signal du NADH dissocié donc indépendant du phénomène de FRET, est très faible par rapport à l'amplitude des phases exponentielles. L'amplitude de la phase qui correspondrait à l'isomérisation du NADH est augmentée par rapport à l'amplitude de la phase d'acylation. Le signal de FRET constituerait donc une sonde plus sensible que la fluorescence intrinsèque du NADH pour la détection de cette isomérisation.

2. Identification du résidu Trp responsable du signal spectroscopique associé à l'isomérisation du NADH

Dans le but d'exploiter ces propriétés pour analyser le mécanisme enzymatique des ALDH hydrolytiques, et de préciser la spécificité de ce signal, nous avons entrepris l'identification du/des résidus Trp de la RALDH2 à l'origine des propriétés spectroscopiques du couple enzyme/NADH. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur la comparaison des séquences de la RALDH2, qui présente ce signal, et de la GAPN qui ne le présente pas. En effet la RALDH2 contient six résidus Trp dont deux sont conservés dans la GAPN (Trp28 et Trp76) (figure 32).

Résultats : Partie 2

	10	20	30	40	50	60		
<i>RALDH1</i> hum.	SSSGT	PDLPV	LLTDLKIQYT	KIFINNEWHD	SVSGKKFPVF	NPATEEELCQ	VEEGDKEDVD	60
<i>RALDH2</i> rat	--ASLQLLPS	PTPNLEIKYT	KIFINNEWQN	SESGRVFPVC	NPATGEQVCE	VQEQADKVDID		58
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	-----	-----MTKQY	KNYVNGEWKL	SEN--EIKYI	EPASGAELGS	VPAMSTEEVD		43
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	-----	---MAEIRKL	KNYINGEWVE	SKTDQYEDVV	NPATKEVLCQ	VPISTKEDID		47
	70	80	90	100	110	120		
<i>RALDH1</i> hum.	KAVKAARQAF	QIGSPWRTMD	ASERGRLLYK	LADLIERDRL	LLATMESMNG	GKLYSNAYLN		120
<i>RALDH2</i> rat	KAVQAARLAF	SLGSVWRMD	ASERGRLLDK	LADLVERDRA	TLATMESLNG	GKPFLLQAFYI		118
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	YVYASAKKAQ	PA---WRSLS	YIERAAYLHK	VADILMRDKE	KIGAVLSKEV	AKGYKSAVSE		100
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	YAAQTAAEAF	KT---WSKVA	VPRRARILFN	FQQLLSQHK	ELAHLITTIEN	GKNTKEALGE		104
	130	140	145	154	164	174		
<i>RALDH1</i> hum.	DLAGCIKTLR	YCAGNADKIQ	GRTIP----	-IDGNFFTYT	RHEPIGVCGQ	IIPWNFPLVM		174
<i>RALDH2</i> rat	DLQGVIKTLR	YYAGWADKIH	GMTIP----	-VDGDFYFTF	RHEPIGVCGQ	IIPWNFPLLM		172
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	VVR-TAEIIN	YAAEGLRME	GEVLEGGSF	AASKKKIAV	RREPVLVLA	ISPFNYPNL		159
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	VGR-GIENVE	FAAGAPSLMM	GDSLAS----	-IATDVEAAN	YRYPIGVVGG	IAPNFPMVM		158
	184	194	204	214	224	234		
<i>RALDH1</i> hum.	LIWKIGPALS	CGNTVVVKPA	EQTPLTALHV	ASLIKEAGFP	PGVVNIVPGY	GPTAGAAISS		234
<i>RALDH2</i> rat	FTWKIAPALC	CGNTVVVKPA	EQTPLSALY	GALIKEAGFP	PGVVNIPGY	GPTAGAAIAS		232
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	AGSKIAPALI	AGNVIAFKPP	TQGSISGLL	AFAFAEAGLP	AGVFNITGR	GSEIGDYIVE		219
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	PCVMFMAIA	LGNTFILKPS	ERTPLLTEKL	VELFEKAGLP	KGVFNIVYG-	AHDVVNGILE		217
	244	254	264	274	284	294		
<i>RALDH1</i> hum.	HMDIDKVAFT	GSTEVGKLIK	EAAGKSNLKR	VTLELGGKSP	CIVLADADLD	NAVEFAHHGV		294
<i>RALDH2</i> rat	HIGIDKIAFT	GSTEVGKLIQ	EAAGRSNLKR	VTLELGGKSP	NIIFADADLD	YAVEQAHQGV		292
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	HQAVNFINF	GSTGIGERIG	KMAG---MRP	IMLELGGKDS	AVLEDADLE	LTAKNIIAGA		276
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	HPEIKAISFV	GSKPVGEVYV	KKGSE-NLKR	VQSLTGAKNH	TIVLNDANLE	DTVTNIVGAA		276
	304	314	324	334	344	354		
<i>RALDH1</i> hum.	FYHQGQC	IAASRIFVEESI	YDEFVRSVE	RAKRYILGNP	LTPGVTQGPQ	IDKEQYDKIL		354
<i>RALDH2</i> rat	FFNQGCCTA	GSRIFVEESI	YEEFVKRSVE	RAKRRIVGSP	FDPTEQGPQ	IDKKQYNKIL		352
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	FGYSGQRCTA	VKRVLVMESV	ADELVEKIRE	KVLALTIGNP	ED-DADITPL	IDTKSADYVE		335
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	FGSAGERCMA	CAVVTVEEGI	ADEFMAKLOE	KVADIKIGNG	LDDGVFLGPV	IREDNKKRTL		336
	364	373	383	393	403	413		
<i>RALDH1</i> hum.	DLIESGKKEG	AKLECGGGP-	WGNKGYFVQP	TVFSNVTDEM	RIAKEEIFGP	VQQIMKFKSL		413
<i>RALDH2</i> rat	ELIQSGVAEG	AKLECGGKG-	LGRKGGFFIEP	TVFSNVTDDM	RIAKEEIFGP	VQEILRFKTM		411
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	GLINDANDKG	AAALTEIK--	--REGNLICP	ILFDKVTTDM	RLAWEEPFGP	VLPPIRVTSV		391
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	SYIEKGLEEG	ARLVCDGREN	VSDDGYFVGP	TIFDNVTTEM	TIWKDEIFAP	VLSVIRVKNL		396
	423	433	443	453	462	472		
<i>RALDH1</i> hum.	DDVIKRANNT	FYGLSAGVFT	KDIDKAITIS	SALQAGTVV	NCYGVVS-AQ	CPFGGFKMSG		472
<i>RALDH2</i> rat	DEVIERANNS	DFGLVAAVFT	NDINKALMVS	SAMQAGTVVI	NCYNALN-AQ	SPFGGFKMSG		470
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	EAAIEISNKS	EYGLQASIFT	NDFPRAFGLA	EQLEVGTVVI	NNKTQRGTDN	FPFLGAKKSG		451
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	KEAIEIANKS	EFANGACLFT	SNSNAIRYFR	ENIDAGMLGI	NLGPAPMAF	FPFSGWKSSF		456
	480	490	500					
<i>RALDH1</i> hum.	NG--RELGEY	GFHEYTEVKT	VTVKISQKNS-	500				
<i>RALDH2</i> rat	NG--REMGEF	GLREYSEVKT	VTVKIPQKNS-	498				
<i>GAPN</i> <i>S. mut.</i>	AG-IQGVKYS	IEAMTVKSV	VFDIK-----	475				
<i>MSDH</i> <i>B. sub.</i>	FGTLHANGKD	SVDFYTRKKV	VTARYPAPDFN	487				

Figure 32 : Alignement des séquences de la RALDH1 humaine, la RALDH2 de rat, de la GAPN de *S. mutans* et de la MSDH de *B. subtilis*

Les résidus tryptophane conservés dans ces enzymes sont surlignés en bleu, les autres résidus tryptophane présents dans les RALDH1 et 2 ainsi que les positions équivalentes dans la MSDH et la GAPN sont surlignés en rose. La Cys302 catalytique est surlignée en rouge.

Un autre (Trp168) est situé dans la cavité correspondant au site de basculement de la partie NMNH du cofacteur réduit dans la structure de l'intermédiaire thioacylenzyme de GAPN, et était de ce fait un bon candidat pour participer au transfert de fluorescence observé dans la RALDH2 (figure 33). L'étude systématique de la contribution des résidus Trp non conservés de la RALDH2, c'est-à-dire les résidus tryptophane situés aux positions 135, 168, 177 et 452, au phénomène de FRET a donc été entreprise. Les variants W135F, W168F, W177F, W452F ont été générés et l'étude des signaux d'émission de fluorescence du NADH et de FRET a été réalisée pour l'étape d'acylation.

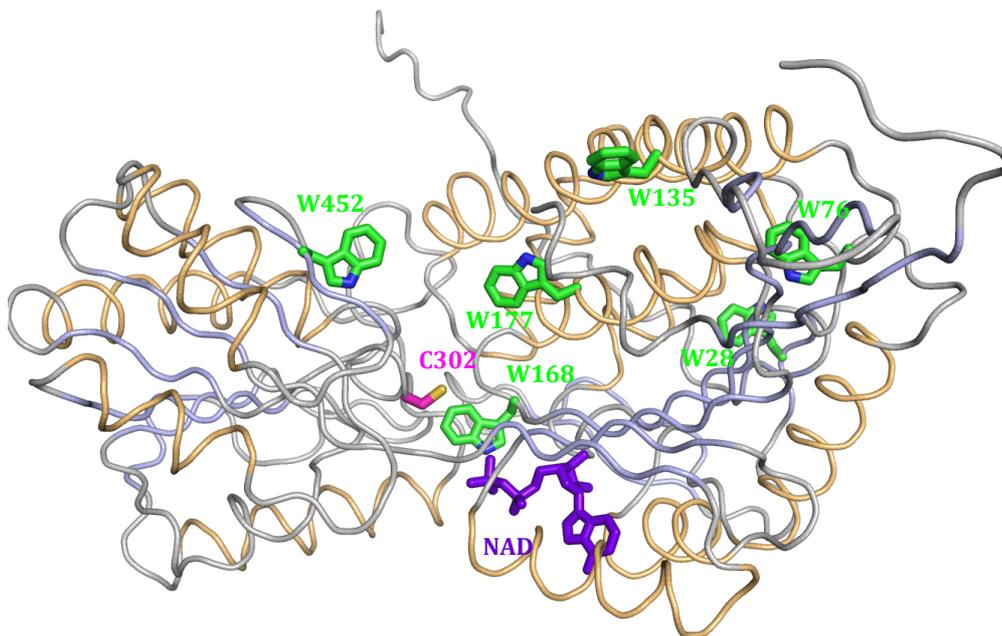


Figure 33 : Structure du monomère de la RALDH2 de rat sous forme holoenzyme (code pdb 1bi9).

Les six résidus tryptophane de l'enzyme sont représentés en vert, la C302 catalytique est représentée en rose et le cofacteur NADH est représenté en violet (dans cette structure, seule la partie adénosine du cofacteur est définie). Seules les chaînes principales sont représentées sur cette figure. Cette figure a été réalisée à l'aide du logiciel PyMol à partir du fichier pdb 1bi9. Les hélices α sont représentées en jaune, les brins β en bleu et les régions ne présentant pas d'élément structure secondaire sont représentés en gris.

2.1. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire

De façon générale, les paramètres cinétiques déterminés à pH optimum (8,5) pour les mutants W135F, W168F, W177F et W452F de la RALDH2 montrent que les constantes d'affinité apparentes K_M diffèrent peu de celles de la RALDH2 de type sauvage. En effet le K_M du NAD pour les mutants W135F et W452F est augmenté d'un facteur environ 2,5, et la valeur du K_M du décanal pour le mutant W135F est augmentée d'un facteur 4. Pour les mutants W452F, W177F et W135F, la vitesse globale de la réaction est respectivement

Résultats : Partie 2

diminuée d'un facteur 1,6, 2,9 et 7,6 par rapport à l'enzyme de type sauvage. Ces comparaisons sont pertinentes dans la mesure où l'étape limitante reste associée à la désacylation pour les mutants cités (voir paragraphe suivant). Par contre, la substitution W168F conduit à une diminution de la vitesse globale de la réaction d'un facteur 40 par rapport au type sauvage.

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)		Etape limitante
		NAD	Décanal	
Type sauvage	2,2 ± 0,2	64 ± 4	6 ± 1	Désacylation
W135F	0,29 ± 0,03	176 ± 11	25 ± 2	Désacylation
W168F	0,055 ± 0,002	28 ± 4	8 ± 1	Acylation
W177F	0,77 ± 0,03	68 ± 16	13 ± 1	Désacylation
W452F	1,35 ± 0,04	157 ± 11	6 ± 1	Désacylation

Tableau 3 : Paramètres cinétiques déterminés à l'état stationnaire pour le type sauvage et les différents mutants de la RALDH2 de rat.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à 25°C dans un tampon Hépès 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, tween 80 0,05% à pH 8,5. La concentration en décanal est fixée à 50 μM pour la détermination des K_M pour le NAD ; La concentration en NAD est fixée à 2 mM pour la détermination des K_M pour le décanal. Les résultats expérimentaux ont été analysés suivant le modèle classique de Michaelis-Menten.

2.2. Cinétiques à l'état préstationnaire

Pour permettre une comparaison pertinente des effets observés sur les propriétés catalytiques des variants générés, il était nécessaire de déterminer si, comme pour le type sauvage, l'étape limitante restait associée à la désacylation. Pour ce faire, des tests ont été réalisés en cinétique rapide en présence de décanal pour l'ensemble des variants de la RALDH2 (figure 34 p. 83). A l'exception du variant W168F, un saut de production de NADH a été observé, montrant que l'étape limitante restait associée à la désacylation pour les variants W135F, W177F et W452F comme pour l'enzyme de type sauvage. Par contre, aucun saut n'est observé pour le variant W168F, indiquant que l'étape limitante est associée à l'acylation. Par conséquent, la substitution W168F conduit à une diminution d'un facteur environ 1000 de la constante de vitesse observée pour l'étape d'acylation par rapport au type

sauvage (k_{obs} de 54 s^{-1}). Ceci suggère un rôle majeur du résidu W168, situé à proximité du site actif, dans la formation d'un complexe ternaire RALDH2/NAD/substrat catalytiquement efficace.

En ce qui concerne les autres mutants de la RALDH2, deux types de comportement cinétique ont été observés pour le suivi de l'évolution du signal de fluorescence du NADH à l'état préstationnaire (figure 34). D'une part, les mutants W135F et W452F présentent des cinétiques similaires à celle du type sauvage, avec cependant une diminution de l'amplitude des différentes phases, probablement due à la diminution de la fluorescence intrinsèque des différentes conformations du NADH au sein du complexe ternaire thioacylenzyme/NADH. Ces substitutions modifieraient donc à distance l'environnement du NADH, conduisant à une diminution du rendement quantique et/ou une augmentation de l'effet d'écran sur la fluorescence du NADH. D'autre part, la cinétique mesurée pour le mutant W177F est caractérisée non seulement par une diminution de l'amplitude de la phase correspondant à l'acylation, mais également par l'absence d'une phase décroissante suivant l'étape initiale d'acylation. Seules une phase exponentielle croissante similaire à celle observée pour le type sauvage et une phase linéaire sont détectées pour ce mutant (figure 34). Le processus d'isomérisation du cofacteur réduit étant indispensable à la catalyse, il est probable que cette phase ne soit simplement plus détectée pour ce mutant. La présence du W177 induirait donc une modification de l'environnement du NADH dans la conformation adoptée au cours du transfert d'hydrure, qui se traduirait par une intensité de fluorescence supérieure à celle observée après isomérisation, et permettrait ainsi de visualiser le processus d'isomérisation du cofacteur au cours de la catalyse.

Les profils cinétiques obtenus dans les conditions de détection du signal de FRET sont similaires à ceux décrits en fluorescence directe du NADH. Dans tous les cas, la pente de la phase linéaire, qui correspond au signal du NADH dissocié donc indépendant du phénomène de FRET, est très faible par rapport à l'amplitude des phases exponentielles. Dans le cas de la cinétique réactionnelle du mutant W177F, la diminution de l'amplitude de la phase correspondant à l'acylation est plus importante que pour la cinétique d'évolution du signal de fluorescence intrinsèque du NADH. Ce résidu contribue donc de façon majeure au phénomène de FRET avec le NADH dans sa conformation adoptée pendant le transfert d'hydrure. De plus, l'absence d'une phase cinétique décroissante, potentiellement associée à l'isomérisation du groupement NMNH, suggère que dans le cas de l'enzyme sauvage, la

Résultats : Partie 2

variation d'intensité du signal du transfert de fluorescence en fonction de la conformation du NADH est associée au Trp177. Enfin, en mode de détection FRET, le signal linéaire associée à la désacylation étant très faible, le signal correspondant au processus d'isomérisation est mesuré de façon plus sensible qu'en mode de fluorescence direct.

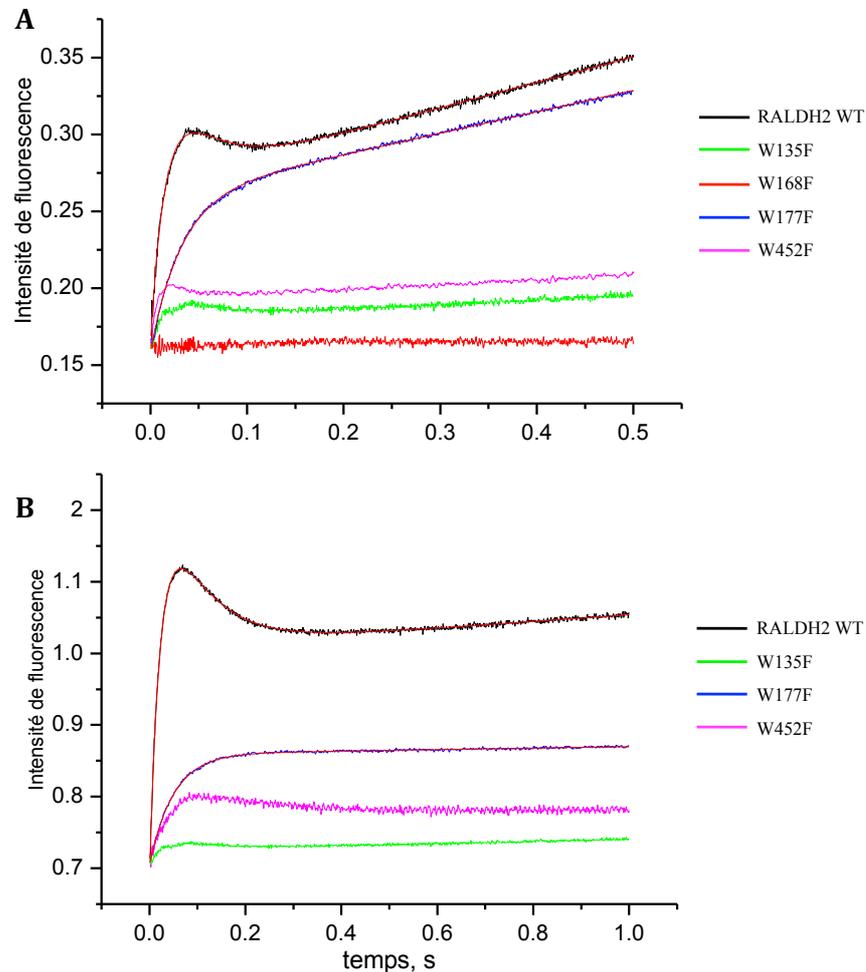


Figure 34 : Etude à l'état préstationnaire de la réaction catalysée par le type sauvage et les différents mutants de la RALDH2.

Les mesures sont effectuées dans le tampon d'activité (Hépes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 80 0,05 %, pH 8,5) à 25°C, à une concentration de 1 μ N d'enzyme. Le photomultiplicateur est réglé à 400 V. Les cinétiques de l'enzyme sauvage sont ajustées à une équation de type double exponentielle combinée à une phase linéaire ; et celles du mutant W177F à une équation de type monoexponentielle et une phase linéaire (tracé théorique en rouge).

A) Cinétiques d'apparition du NADH au cours du temps pour la RALDH2 sauvage et les mutants W135F, W168F, W177F et W452F (représentées respectivement en noir, vert, rouge, bleu et rose). Le NADH est excité spécifiquement à 350 nm et un filtre permet de détecter le signal de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à 395 nm. **B)** Cinétiques observées en mode de détection du signal de FRET pour la RALDH2 sauvage et les mutants W135F, W177F et W452F (représentées respectivement en noir, vert, bleu et rose). Les résidus tryptophane de l'enzyme sont excités spécifiquement à 295 nm et un filtre permet de détecter le signal de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à 395 nm.

3. Modélisation cinétique du cycle catalytique de la RALDH2

Ces résultats ont donc permis d'identifier un signal spectroscopique permettant la caractérisation cinétique de l'isomérisation du cofacteur réduit au cours de la catalyse. Dans le but de caractériser les facteurs moléculaires contrôlant ce basculement, il est nécessaire de déterminer la constante de vitesse associée à cette étape d'isomérisation. Pour ce faire, l'établissement d'un modèle réactionnel s'avère nécessaire pour simuler et analyser les données expérimentales.

Le modèle proposé pour décrire les étapes cinétiques du cycle catalytique inclut les données disponibles pour le mécanisme enzymatique de différentes ALDH hydrolytiques (figure 35 p. 85). Un mécanisme cinétique de type séquentiel ordonné a été décrit et semble être commun à l'ensemble des ALDH de cette famille (Bradbury et Jakoby, 1971 ; Eckfeldt et Yonetani, 1976 ; MacGibbon *et al.*, 1977 ; Bostian et Betts, 1978 ; Vallari et Pietruszko, 1981 ; Trost et Pupillo, 1993 ; Marchal *et al.*, 2000). La première étape du cycle catalytique correspond donc à la fixation du cofacteur NAD oxydé (constantes de vitesse k_n et k_{-n}), suivie de celle du substrat aldéhyde S, puis de l'attaque de la Cys catalytique pour former le complexe ternaire thiohémiacétal/NAD (constantes de vitesse k_1 et k_{-1}). C'est au sein de cet intermédiaire que se produit l'étape de transfert d'hydrure qui aboutit à la formation de NADH dans le complexe ternaire thioacylenzyme (étape considérée comme irréversible, de constante de vitesse k_2). Au sein de ces trois étapes qui constituent l'acylation, le processus cinétiquement limitant, déterminé dans le cas de la GAPN de *S. mutans*, est associé au transfert d'hydrure (Cobessi *et al.*, 2000). En élargissant ce résultat aux autres ALDH hydrolytiques, nous avons admis l'hypothèse que les deux premières étapes étaient en équilibre rapide par rapport au transfert d'hydrure, ce qui se traduit en termes cinétiques par des valeurs des constantes de vitesse fixées de telle sorte que les constantes de premier ordre $k_n[\text{NAD}]$, k_{-n} , $k_1[\text{S}]$ et k_{-1} soient très élevées par rapport à k_2 .

A l'issue du transfert d'hydrure, la partie NMNH du cofacteur bascule lors de l'étape d'isomérisation (constante de vitesse k_f) et c'est cette conformation du complexe thioacylenzyme indiquée par une étoile (*) qui subit l'étape de désacylation. Cette dernière étape étant cinétiquement limitante pour la réaction globale, elle a été modélisée en une seule étape de constante de vitesse k_p qui inclut les étapes d'hydrolyse et de dissociation du produit puis du cofacteur réduit NADH.

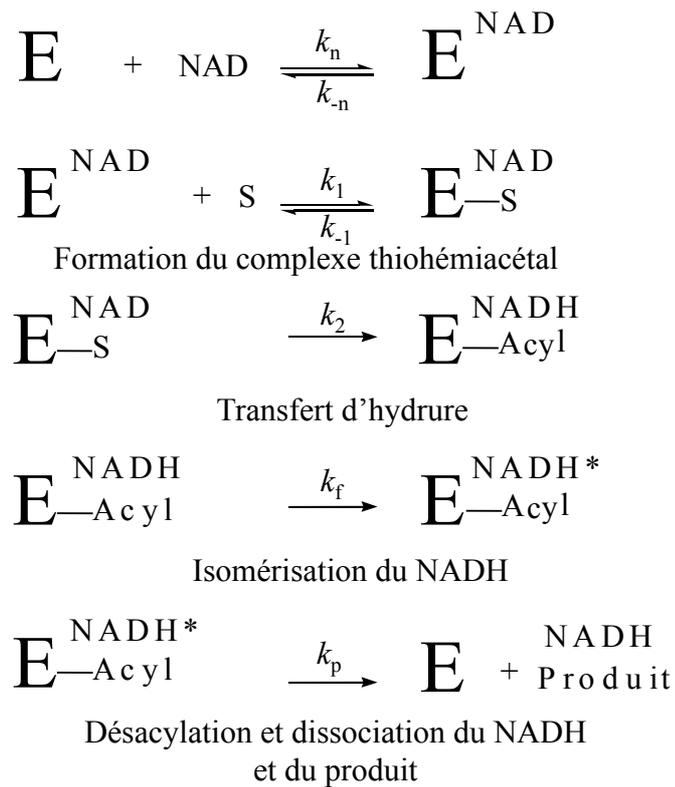


Figure 35 : Modèle réactionnel minimal de la réaction catalysée par les ALDH hydrolytiques.

E : enzyme ; S : substrat ; E-Acyl : intermédiaire thioacylenzyme ; NADH* : conformation du NADH après isomérisation ; k_n et k_{-n} : constantes de vitesse de l'étape de fixation du NAD ; k_1 et k_{-1} : constantes de vitesse de l'étape de formation du complexe thiohémiacétal ; k_2 : constante de vitesse de l'étape du transfert d'hydrure ; k_f : constante de vitesse de l'étape d'isomérisation du NADH ; k_p : constante de vitesse de l'étape de désacylation.

3.1. Principe et intérêt de l'ajustement global des données expérimentales

Cette description du mécanisme réactionnel implique, à partir des cinétiques obtenues en mode fluorescence ou FRET, la détermination de nombreux paramètres : les trois constantes de vitesse k_2 , k_f et k_p , ainsi que les facteurs d'intensité de fluorescence relatifs des espèces détectées, à savoir le NADH libre, le NADH au sein du complexe thioacylenzyme à l'issue du transfert d'hydrure, et le NADH au sein de ce même complexe après isomérisation (*). Afin de déterminer ces constantes, et en particulier k_f qui correspond à l'étape d'isomérisation, avec suffisamment de justesse et de précision, il s'avère donc nécessaire de traiter un nombre suffisant de cinétiques expérimentales recueillies par exemple, à différentes concentrations en substrat.

Le logiciel Dynafit créé par Petr Kuzmic (Kuzmic, 1996) est dédié à la simulation et l'analyse de cinétiques chimiques et enzymatiques sur la base d'un mécanisme décrit directement par des équations symboliques et caractérisées par des constantes cinétiques individuelles. L'évolution de la concentration des différentes espèces est calculée par

intégration numérique simultanée des équations différentielles correspondant aux étapes du mécanisme et des équations de conservation de la masse. Il n'est donc pas nécessaire de dériver les équations mathématiques complexes qui décrivent un mécanisme enzymatique à plusieurs étapes.

<pre>[mechanism] E + N <====> EN : kn ; k-n EN + S <====> ES : k1 ; k-1 ES ----> EacNH : k2 EacNH ----> EacNH* : kf ; k-f EacNH* ----> E + P + NH : kp</pre>	 <p><i>Définition du mécanisme catalytique et des constantes de vitesse</i></p>
<pre>[constants] kn = 100, k-n = 100 k1 = 100, k-1 = 500 k2 = 50 ? kf = 10 ? kp = 0.5 ?</pre>	 <p><i>Indications des constantes de vitesse des étapes du mécanisme (en $\mu M^{-1}.s$)¹ Un ? indique que le paramètre sera ajusté</i></p>
<pre>[responses] EacNH = 0.9 ? EacNH* = 0.1 ? NH = 0.05 ?</pre>	 <p><i>Contribution de chaque espèce au signal de fluorescence mesuré</i></p>
<pre>[concentrations] local E = 2 ? N = 2000</pre>	 <p><i>Concentration initiale des espèces (en μM)</i></p>
<pre>[progress] directory ./flip22062011Ral2MPD extension txt offset auto ? file : 2306_2_da15, 2306_2_da110, 2306_2_da115, 2306_2_da120, 2306_2_da130, 2306_2_da150 vary conc S = 5 ?, 10 ?, 15 ?, 20 ?, 30 ?, 50?</pre>	 <p><i>Localisation des fichiers, définition des fichiers de données expérimentales et de la concentration de décanal</i></p>
<pre>[output] directory ./flip22062011Ral2MPD/output</pre>	 <p><i>Localisation du fichier des résultats</i></p>
<pre>[settings] <Constraints> ConcError = 0.2</pre>	 <p><i>Prise en compte des erreurs expérimentales jusqu'à 20% sur les concentrations des différentes espèces participant à la réaction</i></p>

Figure 36 : Script utilisé par logiciel Dynafit pour l'analyse des données expérimentales obtenues à l'état préstationnaire de la réaction catalysée par la RALDH2 de type sauvage.

E : enzyme ; N : NAD ; S : substrat ; P : produit ; EacNH, EacNH*, NH : différentes formes du NADH ; kn et k-n : constantes de vitesse de l'étape de fixation du NAD ; k1 et k-1 : constantes de vitesse de l'étape de formation du complexe thiohémiacétal ; k2 : constante de vitesse de l'étape du transfert d'hydrure ; kf et k-f : constante de vitesse de l'étape d'isomérisation du NADH ; kp : constante de vitesse de l'étape de désacylation.

Résultats : Partie 2

L'intérêt supplémentaire de Dynafit est la possibilité d'ajuster simultanément plusieurs jeux de données enregistrés à différentes concentrations en substrat/cofacteur, ce qui permet de déterminer globalement plusieurs paramètres de façon robuste. Enfin, le logiciel permet également de tenir compte d'une marge d'erreur sur les concentrations d'enzyme et de substrats, ce qui est important dans le cas de l'ajustement simultané de cinétiques mesurées indépendamment. Un exemple de script utilisé par Dynafit est présenté figure 36.

3.2. Analyse

Cette approche a été appliquée à la RALDH2 afin d'évaluer la faisabilité de la méthode pour mesurer la constante de vitesse intrinsèque du processus d'isomérisation conformationnelle du NADH au cours de la catalyse. Les cinétiques réactionnelles de la RALDH2 ont été mesurées dans les conditions de détection du signal de FRET, en conditions saturantes en NAD et pour différentes concentrations en décanal. Les cinétiques sont présentées figure 37 p. 89.

L'analyse de ce jeu de données a permis de déterminer les paramètres reportés dans le tableau 4. Malgré de légères déviations, les tracés théoriques révèlent un bon degré de cohérence avec les courbes expérimentales, ce qui indique que le modèle proposé permet de décrire la cinétique enzymatique de façon assez fidèle. Ce modèle pourrait éventuellement être amélioré en intégrant, par exemple, la réversibilité de l'étape de transfert d'hydrure et/ou d'isomérisation. Cette analyse suggère que dans ces conditions expérimentales, les constantes de vitesse d'acylation et d'isomérisation du cofacteur sont proches, de l'ordre de $10\text{-}11\text{ s}^{-1}$ et non limitantes par rapport à l'étape de désacylation de constante de vitesse k_p . Il est à noter que la valeur de la constante de vitesse d'acylation intrinsèque (k_2) est inférieure à la constante de vitesse macroscopique (k_{obs}) obtenue par un ajustement « classique » des cinétiques sous forme d'une combinaison de phases exponentielles. Les facteurs de réponse relatifs des différentes formes du NADH révèlent une intensité du signal de FRET de 40 % et 4 % pour le complexe après isomérisation et la forme libre par rapport au complexe formé à l'issue du transfert d'hydrure. Le processus de basculement de la partie NMNH du NADH conduirait donc à des changements dans l'orientation et la distance avec le W177 responsable de la diminution du FRET entre ces deux fluorophores. Comme attendu, le signal associé au NADH libre est très faible.

Série	Paramètres	Initial	Ajustement	% d'erreur
	k_2 (s ⁻¹)	30	10.6 ± 0.5	5.1
	k_f (s ⁻¹)	10	11.4 ± 0.2	2.2
	k_p (s ⁻¹)	0.5	1.1 ± 0.1	7.1
	r_{EacNH}	0.9	0.8 ± 0.1	10.9
	r_{EacNH^*}	0.1	0.3 ± 0.03	8.1
	r_{NH}	0.02	0.03 ± 0.003	6.8

Tableau 4 : Analyse du jeu de données permettant de déterminer les paramètres du mécanisme réactionnel dans le cas de la RALDH2 de type sauvage.

k_2 : constante de vitesse de l'étape du transfert d'hydrure ; k_f : constante de vitesse de l'étape d'isomérisation du NADH ; k_p : constante de vitesse de l'étape de désacylation ; r_{EacNH} , r_{EacNH^*} et r_{NH} : facteurs de réponse relatifs des différentes formes du NADH.

Dans le cadre d'une étude indépendante du présent projet, visant à modifier la spécificité de substrat de l'enzyme, le résidu L459 de la RALDH2 a été remplacé par le résidu Arg correspondant dans la GAPN (voir figure 32 p. 79). La cinétique réactionnelle du mutant L459R avec le décanal a été étudiée par la même approche que l'enzyme de type sauvage et analysée par la méthode d'ajustement global. De façon surprenante, le profil cinétique de ce mutant révèle une phase correspondant au processus d'isomérisation du cofacteur qualitativement plus sensible et plus lente (figure 38 p. 90). L'ajustement d'un jeu de données obtenues avec cette enzyme à différentes concentrations en décanal, présentée figure 37 p. 89, indique que cette substitution affecte peu la constante de vitesse d'acylation k_2 (13,2 s⁻¹), alors que la constante de vitesse du processus d'isomérisation diminue d'un facteur 3.

Résultats : Partie 2

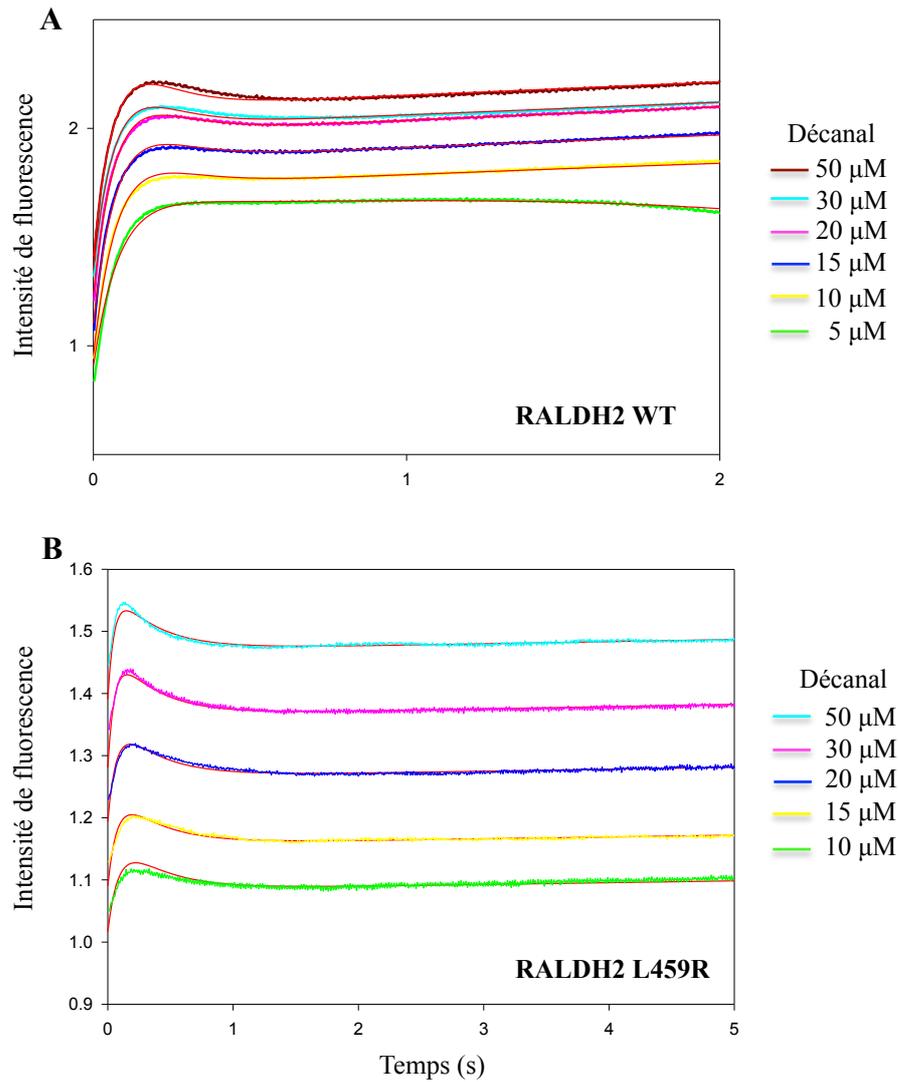


Figure 37 : Etude à l'état préstationnaire de la réaction catalysée par le type sauvage et le mutant L459R de la RALDH2 recueillies en mode de détection du signal de FRET.

Les mesures sont effectuées dans le tampon d'activité (Hépes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MPD 20 %, pH 8,5) à 25°C, à une concentration de 1 μ N d'enzyme à des concentrations variables en décanal. Les résidus tryptophane de l'enzyme sont excités spécifiquement à 295 nm et un filtre permet de détecter le signal de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à 395 nm.

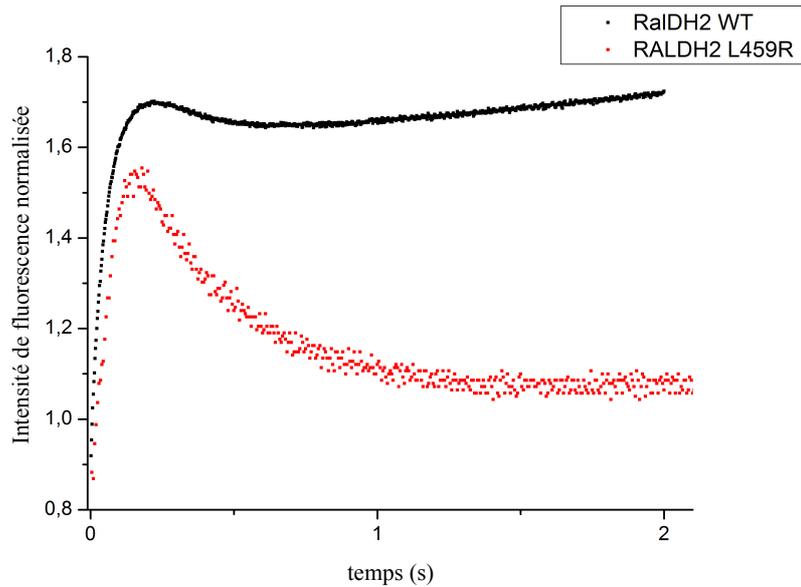


Figure 38 : Comparaison des cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction catalysée par le type sauvage et le mutant L459R de la RALDH2 recueillies en mode de détection du signal de FRET.

Les mesures sont effectuées dans le tampon d'activité (Hépes 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 80 0,05 %, pH 8,5) à 25°C, à une concentration de 1 μ N d'enzyme. La concentration de NAD et de décanal sont fixées à 2 mM et 50 μ M respectivement.

Cet exemple préliminaire suggère que cette approche constitue une méthode permettant d'étudier l'impact de la modification du site actif de la RALDH2 sur le changement conformationnel du NADH au sein du complexe thioacylenzyme, au cours du cycle catalytique.

Résultats
PARTIE 3

Impact du mode de stabilisation du cofacteur sur le mécanisme cinétique des ALDH

La nature des facteurs moléculaires à l'origine des différences de mécanisme cinétique observées pour les deux familles d'ALDH non phosphorylantes est une question d'importance en terme d'évolution. En effet, en dépit d'une topologie de repliement et d'une catalyse similaires, l'évolution a conduit à des mécanismes cinétiques différents : un mécanisme séquentiel ordonné avec une dissociation "tardive" du cofacteur pour les ALDH hydrolytiques et un mécanisme ping-pong avec dissociation "précoce" pour les ALDH CoA-dépendantes. Ceci pose la question des bases moléculaires à l'origine de cette différence.

Dans le cas des ALDH CoA-dépendantes une des hypothèses est que les sites de fixation du CoA et du cofacteur NAD se superposent au moins partiellement. Le départ du NADH serait alors un préalable à la liaison du CoA. Cette hypothèse a depuis été écartée par les résultats d'une étude cinétique suggérant l'existence de sites de liaison distincts pour le NAD et le CoA (Talfournier *et al.*, 2011). Une alternative serait l'absence de la cavité décrite pour les ALDH hydrolytiques rendant impossible l'isomérisation du cofacteur réduit. Dans le but d'identifier ces bases moléculaires, l'équipe avait engagé une collaboration avec le groupe de Biocristallographie de Nancy (Drs A. Aubry et C. Didierjean UMR CNRS-Université de Lorraine 7036) en vue d'obtenir la première structure cristalline d'une ALDH CoA-dépendante : la MSDH de *B. subtilis*.

La structure du complexe binaire MSDH/NAD a été obtenue à une résolution de 2,5 Å. Comme attendu, la structure globale de la MSDH est similaire à celles des ALDH hydrolytiques tétramériques. Par contre, dans le site de liaison du NAD, la partie NMN est bien définie dans les cartes de densité électronique grâce à une stabilisation du cycle nicotinamide par le biais de liaisons hydrogène directes et indirectes établies avec la fonction carboxamide. Cette structure révèle également que le processus d'isomérisation conformationnelle de la partie NMNH du cofacteur réduit est rendue possible par l'existence de la cavité déjà identifiée pour les ALDH hydrolytiques. La superposition des structures des complexes binaires cristallins ALDH/NAD(P) de la MSDH et des ALDH hydrolytiques révèle que dans la MSDH, le cycle adénine du NAD est significativement plus exposé au solvant. L'analyse de la poche de liaison de l'adénine a permis de mettre en évidence plusieurs éléments structuraux susceptibles d'expliquer cette différence : i) la présence d'un résidu Val en position 229 qui réduit la profondeur de la poche dans la MSDH, augmentant ainsi son accessibilité au solvant et ii) l'absence d'un résidu Gly en position 225 à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_F (voir figure S4 p 106). Ces observations suggéraient un rôle du mode liaison du cycle

Résultats : Partie 3

adénine dans la dynamique du cofacteur réduit au cours du cycle catalytique de la MSDH. Pour valider cette hypothèse, un résidu Gly a été inséré en position 225 et/ou la Val229 a été substituée par une glycine (résidu conservé dans les ALDH hydrolytiques), et les propriétés cinétiques des différents variants ont été analysées. En particulier, j'ai évalué l'impact de ces mutations sur la constante de vitesse apparente associée à la dissociation du cofacteur réduit (k_{off}) au cours de la réaction, en utilisant la lactate déshydrogénase comme système enzymatique couplé. Les résultats obtenus montrent que le k_{off} est diminué d'un facteur 20 à 56 selon les variants, ce qui confirme notre hypothèse de travail. En ce qui concerne le variant V229G, la diminution d'un facteur 20 du k_{off} résulte sans doute d'un mouvement du cycle adénine vers l'intérieur de la poche suite à l'absence de gêne stérique, sa stabilisation pouvant être accrue par l'établissement de contacts de van der Waals supplémentaires. L'interprétation est différente pour le variant ::G225 (insertion d'un résidu Gly en 225) car dans ce cas, la boucle localisée à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_F est plus longue, induisant un probable changement conformationnel qui aurait comme conséquence une stabilisation plus importante de l'adénine (k_{off} diminué d'un facteur 56). Cependant, le fait que ces valeurs restent légèrement supérieures aux valeurs de k_{cat} indique également que l'étape limitante reste associée à la β -décarboxylation mais avec une forte contribution de la dissociation du NADH.

Dans le but d'essayer de rendre cette étape limitante, j'ai essayé d'améliorer la stabilisation du cycle adénine en combinant d'autres mutations à celles caractérisées. La substitution H226P avait pour objectif de mimer le contexte moléculaire de la plupart des ALDH hydrolytiques et introduisait de fortes contraintes géométriques qui pouvaient induire une fermeture de la boucle localisée à l'entrée de la poche de liaison sur le cycle adénine. D'autre part, les substitutions Y252L et V253I augmentaient le caractère hydrophobe des résidus à ces positions et pouvaient permettre l'établissement de contacts de van der Waals supplémentaires. Cette approche n'a pas été concluante car l'étape d'acylation est devenue limitante pour l'ensemble des variants produits, avec une diminution de la constante de vitesse observée d'un facteur $1,1 \cdot 10^4$ à $5 \cdot 10^4$. Ces effets cinétiques très importants sont sans doute la conséquence d'une modification du positionnement du cycle nicotinamide par rapport à l'intermédiaire thiohémiacétal qui conduit à un transfert d'hydrure beaucoup moins efficace. Cela suggère également que des modifications affectant la poche de liaison de l'adénine, et donc probablement le positionnement de cette dernière, auraient des répercussions à plus longue distance jusqu'au cycle nicotinamide.

Publication : "Adenine binding mode is a key factor in triggering the release of NAD(P)H in the aldehyde dehydrogenase superfamily"

J. Biol. Chem., **287** (37), 31095–31103. (2012)

Adenine Binding Mode Is a Key Factor in Triggering the Early Release of NADH in Coenzyme A-dependent Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase^{*[5]}

Received for publication, February 7, 2012, and in revised form, July 2, 2012. Published, JBC Papers in Press, July 10, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.350272

Raphaël Bchini^{†1}, Hélène Dubourg-Gerecke^{§1}, Sophie Rahuel-Clermont[‡], André Aubry^{§†}, Guy Branlant^{‡2}, Claude Didierjean[§], and François Talfournier^{‡3}

From the [‡]Unité Mixte de Recherche CNRS-Université de Lorraine 7214 AREMS, ARN-RNP Structure-Fonction-Maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Faculté de Médecine, Biopôle, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France and the [§]Unité Mixte de Recherche Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, Equipe Biocristallographie, UMR 7036 CNRS-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Background: Conformational dynamics of the cofactor are essential for catalysis by hydrolytic ALDHs.

Results: Crystallographic and kinetic data reveal the molecular basis for NADH release in MSDH, a CoA-dependent ALDH.

Conclusion: Weaker stabilization of the adenine ring triggers early NADH release in MSDH-catalyzed reaction.

Significance: First description of the mechanism whereby the cofactor binding mode is partly responsible for the kinetic behavior of CoA-dependent ALDHs.

Structural dynamics associated with cofactor binding have been shown to play key roles in the catalytic mechanism of hydrolytic NAD(P)-dependent aldehyde dehydrogenases (ALDH). By contrast, no information is available for their CoA-dependent counterparts. We present here the first crystal structure of a CoA-dependent ALDH. The structure of the methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MSDH) from *Bacillus subtilis* in binary complex with NAD⁺ shows that, in contrast to what is observed for hydrolytic ALDHs, the nicotinamide ring is well defined in the electron density due to direct and H₂O-mediated hydrogen bonds with the carboxamide. The structure also reveals that a conformational isomerization of the NMNH is possible in MSDH, as shown for hydrolytic ALDHs. Finally, the adenine ring is substantially more solvent-exposed, a result that could be explained by the presence of a Val residue at position 229 in helix α_F that reduces the depth of the binding pocket and the absence of Gly-225 at the N-terminal end of helix α_F . Substitution of glycine for Val-229 and/or insertion of a glycine residue at position 225 resulted in a significant decrease of the rate constant associated with the dissociation of NADH from the NADH/thioacylenzyme complex, thus demonstrating that the weaker stabilization of the adenine ring is a key factor in triggering the early NADH release in the MSDH-catalyzed reaction. This study provides for the first time structural insights

into the mechanism whereby the cofactor binding mode is responsible at least in part for the different kinetic behaviors of the hydrolytic and CoA-dependent ALDHs.

Among the many enzymes that metabolize aldehydes, the members of the aldehyde dehydrogenase (ALDH)⁴ superfamily play a critical role in protecting cells against the cytotoxic and carcinogenic effects of aldehydic compounds. In humans, the clinical importance of ALDHs is supported by the fact that mutations and polymorphisms in ALDH genes that lead to defective aldehyde metabolism are the molecular basis of severe diseases (1, 2). Moreover, several ALDHs appear to be markers for normal and cancer stem cells (3, 4). ALDHs are also known to play central roles in many essential biological functions such as intermediary metabolism, embryogenesis, development, and neurotransmission.

The ALDHs catalyze the NAD(P)⁺-dependent oxidation of a wide variety of aldehydes to their corresponding non-activated or CoA-activated acids via a common two-step chemical mechanism. The acylation step involves the formation of a hemithioacetal intermediate via the nucleophilic attack of the catalytic Cys-302 (the amino acid numbering used for the biochemical and structural data is that defined by Wang and Weiner (5)) on the aldehydic function followed by hydride transfer that leads to formation of a thioacylenzyme intermediate and NAD(P)H. This intermediate then undergoes a nucleophilic attack by an activated water or CoA molecule. Over the past 15 years both mechanistic and structural aspects of hydrolytic ALDHs have been studied extensively (5–13). In addition to local conformational reorganizations of the active site induced by ligand binding that provide the required flexibility

* This work was supported in part by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, and local funds from the Région Lorraine.

[5] This article contains supplemental Figs. S1–S6.

The atomic coordinates and structure factors (code 1T90) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

[†] Deceased.

¹ Both authors contributed equally to this work and were supported by the French Research Ministry.

² To whom correspondence may be addressed. E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

³ To whom correspondence may be addressed. E-mail: francois.talfournier@maem.uhp-nancy.fr.

⁴ The abbreviations used are: ALDH, aldehyde dehydrogenase; ALDH2, class 2 ALDH; MMSA, methylmalonate semialdehyde; MSDH, methylmalonate semialdehyde dehydrogenase; RALDH2, retinal dehydrogenase 2.

Cofactor Dynamics in ALDH Superfamily

for an efficient catalysis (14, 15), one of the key aspects of the chemical mechanism of this ALDH family is the substantial conformational flexibility of the NMN moiety of the cofactor and in particular of the nicotinamide ring.⁵ Indeed, the presence of multiple conformations of the NMN moiety is supported by the majority of the x-ray structures of ALDH-NAD(P)⁺ binary complexes as well as NMR studies and has been hypothesized to be due to the peculiar binding mode of the cofactor to a non-canonical Rossmann fold (9, 16–18). Furthermore, significant efforts have been made to characterize the mode by which the cofactor is stabilized during both the acylation and the deacylation steps. In the acylation step, the NMN moiety must be positioned such that an efficient and stereospecific hydride transfer can occur from the hemithioacetal intermediate to the C-4 of the nicotinamide. The side chain of invariant Glu-399 was shown to play an essential role in this stabilization by anchoring the NMN ribose through hydrogen bonds with its hydroxyl groups (19). Moreover, recent studies support a critical contribution of the β -methyl group of the invariant Thr-244 residue that allows the nicotinamide ring to adopt a productive conformation for hydride transfer (20). Nevertheless, this conformation is not suitable for the deacylation because it would sterically preclude the catalytic Glu-268 from playing its role in the hydrolytic process. The fact that the cofactor remains bound to the enzyme along the two-step catalytic mechanism strongly suggested that movement of the reduced NMN (NMNH) moiety of the NAD(P)H is a prerequisite for completion of the second half of the reaction (21). Indeed, the first structural evidence for this conformational change of the NMNH during the catalytic cycle of hydrolytic ALDHs was provided by the crystal structure of a thioacyl-enzyme intermediate-NADPH complex (7). Specifically, this structure revealed that once the acylation step has occurred, the reduced cofactor adopts a new conformation with a flip of the NMNH moiety, which positions the reduced nicotinamide in a conserved cavity that might constitute the exit door for NAD(P)H.

By contrast, less information is available concerning structural and/or mechanistic aspects of the CoA-dependent ALDHs. In an effort to address this gap in knowledge, our group has for several years been studying the catalytic mechanism of the methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MSDH) from *Bacillus subtilis* (22, 23). This homotetrameric enzyme catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of methylmalonate semialdehyde (MMSA) and malonate semialdehyde to propionyl- and acetyl-CoA, respectively, and has been reported to be involved in *myo*-inositol catabolism (24). In mammals, MSDH is a mitochondrial enzyme that participates in the distal portions of the valine and pyrimidine catabolic pathways (25). A possible correlation between organic acidemia and MSDH deficiency has been explored (26, 27), and very recently, Sass *et al.*

(28) proposed that polymorphism in the human *ALDH6A1* gene encoding MSDH is directly correlated with 3-hydroxybutyric aciduria, a severe metabolic disease. Detailed kinetic studies of the MSDH-catalyzed reaction have shown that (i) the rate constant associated with the acylation step is high ($k_{ac} > 1000 \text{ s}^{-1}$), indicating that the position of the nicotinamide ring relative to the hemithioacetal allows efficient hydride transfer, and (ii) that NADH release occurs before the rate-limiting β -decarboxylation and CoA attack on the thioacyl-enzyme intermediate (22), thus supporting the ping-pong kinetic mechanism that has previously been reported for other CoA-dependent ALDHs (29, 30).

Taken together these data raise important questions regarding the evolution of the catalytic mechanism within the ALDH superfamily. In particular, it is of interest to determine whether the pattern of interactions that is thought to stabilize an efficient hydride transfer conformation of the NMN moiety of the cofactor in the hydrolytic ALDHs is also operative in the members of the CoA-dependent family. Additionally, two key aspects related to the structural dynamics associated with the release of the reduced cofactor remain to be addressed, (i) whether cofactor isomerization after hydride transfer occurs in CoA-dependent ALDHs and ii) the molecular and structural factors responsible for the early or late release of the reduced cofactor occurring in the catalytic cycle of CoA-dependent and hydrolytic ALDHs, respectively.

We detail here the first crystal structure of a CoA-dependent ALDH. The structure of the binary MSDH/NAD⁺ complex shows that, in contrast to what is observed in nearly all x-ray structures of hydrolytic ALDH-NAD(P)⁺ binary complexes, the nicotinamide ring is well defined in the electron density due to direct and H₂O-mediated hydrogen bonds between the amino group of the carboxamide and residues belonging to the cofactor binding and the catalytic domains. Moreover, the pocket that is postulated to constitute the exit door of the reduced cofactor in the hydrolytic ALDHs is conserved, thus suggesting that a cofactor isomerization also occurs in MSDH and the entire CoA-dependent ALDH family. Finally, superimposition of all ALDH holo-structures reveals that the adenine ring of NAD⁺ is substantially more solvent-exposed in MSDH. Analysis of the adenine binding pocket highlights several structural factors that could explain this marked difference; (i) the presence of a Val residue at position 229 in the MSDH that reduces the depth of the binding pocket, thereby increasing the solvent exposure of the adenine ring, and (ii) the absence of Gly-225 at the N-terminal end of helix α_F . These observations suggest a major role for the adenine binding mode in the dynamics of the reduced cofactor in the MSDH catalytic mechanism. Indeed, substitution of glycine for Val-229 and/or insertion of a glycine residue at position 225 in the MSDH from *B. subtilis* resulted in a significant decrease of the rate constant associated with the dissociation of NADH from the NADH/thioacyl-enzyme complex, thus validating this assumption.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—NAD⁺ was purchased from Roche Applied Science. CoA, pyruvate, and lactate dehydrogenase (LDH) were from Sigma. MMSA was synthesized as described by Kupiecki

⁵ The nicotinamide ring is well defined in the electron density maps in the crystal structures of η -crystallin (PDB code 1o9j) and ALDH1L1 (PDB code 2O2Q). However, η -crystallin is an inactive ALDH that acts as a UV/blue light filter in the lens, whereas in ALDH1L1 the stabilization of the nicotinamide ring is mainly achieved by formation of a covalent adduct between the C4 of the ring and the catalytic cysteine that is likely non-catalytically relevant.

and Coon (31), and its concentration was determined by titration with MSDH.

Site-directed Mutagenesis, Production, and Purification of Wild-type and Mutated MSDHs from B. subtilis—Site-directed mutagenesis was performed using standard PCR site-directed mutagenesis. Wild-type and mutated MSDHs were produced and purified using a procedure described previously (22). Enzyme concentrations were determined spectrophotometrically by using molar absorption coefficients of $2.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280 nm for wild-type and mutated MSDHs. In the present paper, enzyme concentrations are expressed per monomer (normality, N).

Kinetic Parameters for Wild-type and Mutated MSDHs under Steady-state Conditions—Initial rate measurements were carried out at 30 °C on a SAFAS UV mc2 spectrophotometer by following the appearance of NADH at 340 nm in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2). Before kinetic measurements in the presence of MMSA, wild-type and mutated MSDHs were preincubated at 30 °C with 2 mM NAD^+ to activate the enzyme and eliminate the lag-phase exhibited by progress curves for enzymatic turnover (22). The initial rate data were fit to the Michaelis-Menten equation using nonlinear least-squares regression analysis to determine the k_{cat} and K_m values. All K_m values were determined at saturating concentrations of the other substrates.

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

Kinetics of the Acylation Step and of NADH Dissociation of Mutated MSDHs—To study the acylation step, progress curves of NADH production were recorded at 340 nm and at 30 °C in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2) in the absence of CoA. One syringe was filled with 32 μN MSDH and 2 mM NAD^+ , and the other contained 2 mM MMSA.

To evaluate the rate of NADH dissociation from the thioacylenzyme-NADH complex, the coupled pyruvate/lactate dehydrogenase (LDH) assay was used as an NADH trapping system. One syringe was filled with 32 μN MSDH and 2 mM NAD^+ , and the other contained 1 mM MMSA, 32 μN LDH, and 20 mM pyruvate. Experiments were carried out in the absence of CoA in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2) at 30 °C. Data were fit to a biphasic expression.

Crystallization, Data Collection, and Processing—Orthorhombic crystals of the MSDH from *B. subtilis* were obtained from a concentrated protein solution (200 mg/ml) and in the presence of 10 mM NAD^+ . Ammonium sulfate was used as precipitant agent. Detailed protocols for MSDH expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis were reported previously (32).

Phasing and Refinement—The structure of the MSDH from *B. subtilis* was solved by molecular replacement, revealing that MSDH crystallizes with one homotetramer per asymmetric unit like the cod liver betaine aldehyde dehydrogenase used as a search model (18) (PDB entry 1bpw). The structure was initially refined using rigid body minimization and simulated annealing procedures before iterative cycles of manual rebuilding and refinement. Using 20–2.5 Å data, the final R_{free} and R_{cryst} values

TABLE 1

Statistics of x-ray diffraction data collection and model refinement

Values in parentheses refer to the outermost resolution shell.

Space group	$P2_12_12_1$ ^a
Unit-cell parameters (Å)	$a = 195.2, b = 192.5, c = 83.5$ ^a
Resolution range (Å)	20.0–2.5 ^a (2.50–2.59)
R_{merge} (%)	13.8 (37.2) ^a
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9.4 (3.6) ^a
Completeness	99.5 (91.5)
Redundancy	7.3
Refinement	
Resolution range (Å)	20.0–2.5
No. of reflections	108,345 ^a
R/R_{free} (%)	21.1/25.0
No. of atoms	
Protein	3742 per monomer (A, B, C, D)
Ligand (NAD)	44 in each monomer
Water	866
B-factors (Å ²)	
Protein	29.7
Ligand (NAD)	42.0
Water	28.5
Ramachandran statistics (%)	
Residues in preferred regions	89.8
Residues in allowed regions	9.3
Outlier residues	0.9
Root mean square deviations	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	1.3

^a From Ref. 32.

were 0.25 and 0.211, respectively. The asymmetric unit consisted of 4 polypeptide chains (in all monomers, residues Glu-3–Phe-486), 4 NAD^+ molecules, and 866 water molecules. The first two residues and the last residue were not found in electron density maps and so are presumably disordered. The MSDH structure exhibited good geometry, with 89.9% of all residues in the most favored and 9.3% in the allowed regions of the Ramachandran plot as indicated by the program Procheck (33). Molecular replacement calculations and structure refinement were carried out using the CNS program package (34). The graphics programs Turbofrodo (35) and PyMOL were used in model building and in preparation of figures, respectively. Further statistics are summarized in Table 1. The refined coordinates of the model of MSDH and the structure factors have been deposited with the Protein Data Bank under accession code 1T90.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall Structure—As expected, the three-dimensional structure of the MSDH from *B. subtilis* conforms to known tetrameric ALDH structures; the tetramer of the enzyme is a dimer of dimers with strong interactions at the dimer interface but weaker interactions at the tetramer interface (11), and the monomer consists of three domains, the dinucleotide binding domain (residues 3–123 and 141–251), the catalytic domain (residues 252–270), and a small domain (residues 124–140 and 471–486) involved in the oligomerization (Fig. 1). A structural comparison with available entries in the Protein Data Bank database was performed using the PDBeFold server (36). The root mean square deviations upon comparing the $\text{C}\alpha$ traces of all available monomer structures vary from 1.4 to 2.5 Å, the most similar and distant structures being that of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* (PDB code 2wme (37)) and that of dimeric ALDH3 (PDB code 1ad3 (9)).

Cofactor Dynamics in ALDH Superfamily

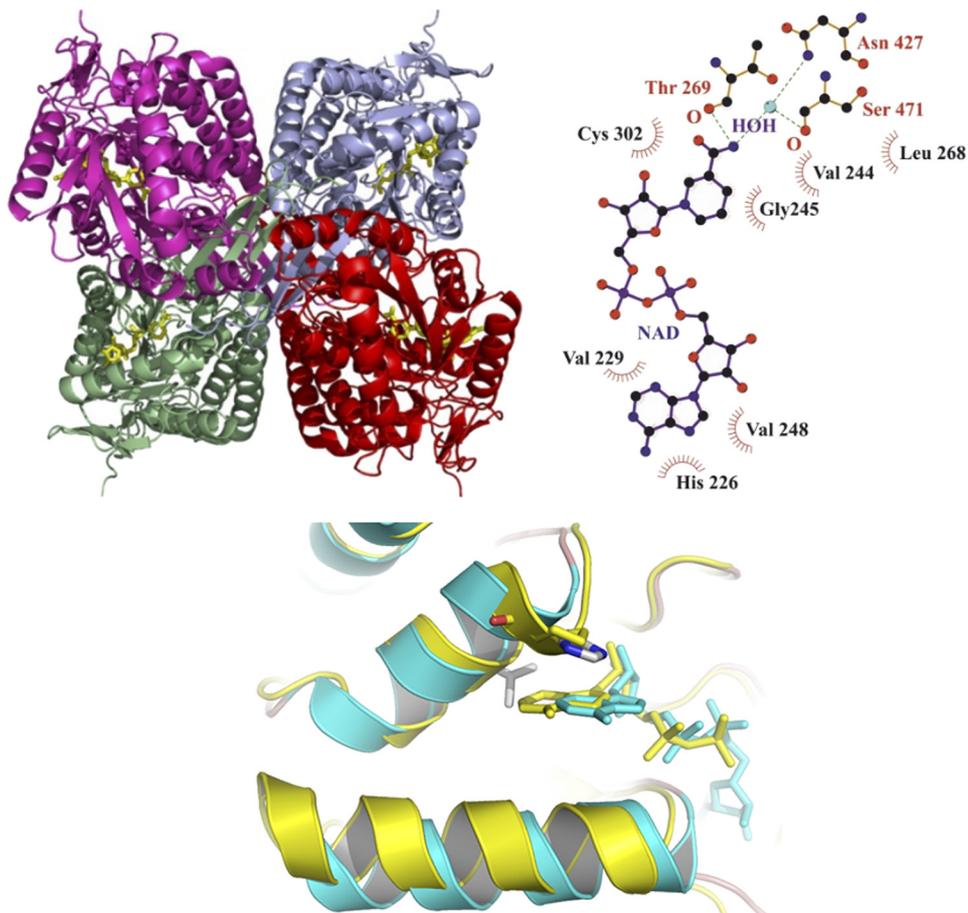


FIGURE 1. **Schematic drawings of the crystal structure of *B. subtilis* MSDH.** Upper left, schematic representation of the overall fold of the MSDH tetramer in which the individual subunits are colored differently. NAD molecules are shown as yellow sticks. Upper right, LIGPLOT drawing (41) of the MSDH NAD binding site. The residues involved in the stabilization of the ribose and pyrophosphate moieties are omitted for clarity. Down, superimposition of schematic representation of the adenine binding site of MSDH (blue) and rat RALDH2 (yellow) is shown. Residues at positions 226 and 229 are represented as sticks colored by atom type and yellow for MSDH and rat RALDH2, respectively. NAD molecules are represented as sticks colored according to the corresponding binding pocket.

The crystal structure of the MSDH from *B. subtilis* did not reveal significant structural differences between the four monomers within each asymmetric unit. Indeed, the average root mean square deviation value obtained from the different pairwise superimpositions of the C α atoms was 0.23 Å, and the monomers exhibited similar average isotropic displacement parameters. Each monomer is occupied by a NAD⁺ molecule that is well defined in the final $2|F_o| - |F_c|$ electron density map (supplemental Fig. S1).

Catalytic Site—Irrespective of the monomer, the side-chain orientation of Cys-302 is similar to that depicted to be catalytically competent for hydrolytic ALDHs (21). At first sight, this observation contradicts our previous data because NAD⁺ binding was shown to elicit a slow conformational change that likely provokes a reorientation of only two Cys-302 residues per tetramer and also a local rearrangement within the dimer interface. Moreover, the presence of two populations of Cys-302 correlated well with the half-site reactivity exhibited by the enzyme (*i.e.* only two subunits are active per tetramer). The apparent discrepancy between solid state and solution data may be explained by either the average crystallographic resolution of the structure or by the much longer time scales for crystallization assays relative to the kinetic experiments. The latter hypothesis is further supported by the low resolution (2.9 Å)

x-ray structure of a thioacylenzyme intermediate recently obtained by soaking the crystals of the binary MSDH/NAD⁺ complex with MMSA, which revealed that in each monomer the catalytic Cys-302 exhibits an additional electron density consistent with the presence of a covalently linked substrate molecule (data not shown). Therefore, the quasi-perfect 222 symmetry of the MSDH structure is not helpful in revealing the molecular basis for the half-site reactivity exhibited by the enzyme. In particular, a critical role of a coenzyme-induced disorder-to-order transition of the loop located at the dimer interface, *i.e.* connecting β_{18} and α_N (supplemental Fig. S2), as proposed for the human ALDH2, remains to be validated (38).

The nicotinamide ring of NAD⁺ is well defined in the electron density maps and is sandwiched between the catalytic Cys-302 on the A-side and the Val-244 and Gly-245 residues on the B-side, respectively. The short distance (3.15 Å) between the sulfur atom of Cys-302 and the C4 atom of the nicotinamide suggests that the NMN portion adopts the so-called “hydride transfer” conformation (21). In addition, the thiol of Cys-302 is positioned between the amide groups of Asn-169 and Asn-427. Asn-169 is invariant within the ALDH superfamily, and its amide group as well as the main-chain nitrogen of Cys-302 were shown to make up an oxyanion hole that allows for an efficient hydride transfer without assistance by a base-catalyst (6). By

contrast, Asn-427 is MSDH-specific and is replaced by Leu in the hydrolytic family (see below and supplemental Fig. S2).

The substrate access tunnel of MSDH can be divided in two parts: a narrow region surrounding the catalytic Cys-302 and a wide region near the tetramer interface. The narrow region can be described as a hydrophobic crown comprising the side chains of Phe-170, Met-173, Trp-177, Met-303, Ala-459, Phe-465, and the aliphatic portion of Arg-301. These seven residues are strictly conserved in the MSDH family except for Ala-459, which is located in the long loop referred to as the substrate specificity loop by Moore *et al.* (39). Nevertheless, the hydrophobic character of the position 459 is conserved as only Ala and Val are found in known MSDH sequences. The entrance of the narrow part of the catalytic tunnel comprises, notably, the side chains of Arg-124 and Arg-301. Very recently, both residues were shown to participate not only in MMSA binding through stabilizing electrostatic interactions with the carboxylate group of the substrate but likely also in positioning MMSA efficiently relative to Cys-302 in the MSDH/NAD⁺/MMSA ternary complex (23).

NMN Binding Site—The four NAD⁺ binding sites are occupied by a cofactor molecule and appear to be equivalent as the four NAD⁺ mean B factors are quite similar (41.2, 42.9, 43.1 and 42.5 Å²). As mentioned above, each dinucleotide molecule is well defined in the electron density map and adopts the extended conformation reported to be suitable for efficient hydride transfer. When compared with other known tetrameric structures of hydrolytic ALDHs, the greatest structural differences are observed in the nicotinamide and adenine binding pockets. First, the MSDH structure reveals a major difference in the stabilization mode of the nicotinamide ring that is well defined in the electron density maps, in contrast to what has been observed in nearly all x-ray structures of binary ALDH-NAD(P)⁺ complexes.⁵ This difference could originate from a stabilization of its conformation through hydrogen bonds between the carboxamide group and the carbonyl group of Thr-269 on the one hand and a water molecule held in position by the carbonyl group of Ser-471 and the side chain of Asn-427 on the other hand (Fig. 1). We, therefore, generated the N427L substitution to determine the consequence of the loss of this MSDH-specific hydrogen bond. This substitution dramatically altered the catalytic properties of the enzyme. The acylation became rate-limiting with a decrease of the associated rate constant by at least 10⁵-fold relative to the wild-type MSDH (*i.e.* <10⁻² versus > 1000 s⁻¹). Although it was not possible to determine whether hydride transfer was rate-determining within the acylation step because of the very low *k*_{cat} value, the dramatic decrease of the *k*_{cat} is likely the consequence of the disruption of the H₂O-mediated hydrogen bond interaction between the carboxamide and the Asn-427, thus leading to formation of an inefficient N427L ternary complex.

By contrast, several interactions known to be essential in the hydrolytic ALDHs for maintaining a productive conformation of the NMN moiety are conserved. The NMN ribose remains anchored through hydrogen bonds between its hydroxyl groups and the side chain of the invariant Glu-399. Additionally, one of the two methyl groups of the β-branched side chain of Val-244 is positioned similarly to the β-methyl of invariant Thr-244 in

hydrolytic ALDHs. Therefore, the methyl could fulfill a similar function as that of Thr-244 due to its positioning via the hydrophobic interaction of the second β-methyl with the side chain of Met-178. Altogether, these structural data suggest that the “classical” pattern of interactions proposed to participate in the stabilization of an efficient hydride transfer conformation of the NMN moiety of the cofactor, once the transient hemithioacetal intermediate is formed, is also operative in the MSDH, a result that is likely generalizable to CoA-dependent ALDHs. However, the contribution of Val-244 in stabilizing the nicotinamide conformation appears not sufficient, whereas the carboxamide/Asn-427 interaction is shown to be essential.

Interestingly, the pocket that is postulated to constitute the exit door of the reduced cofactor in the hydrolytic ALDHs (supplemental Fig. S3) and the interaction pattern that enables the pyrophosphate group to be pliable are conserved (data not shown). Therefore, a conformational isomerization of the NMNH is possible, but questions remain concerning its mechanistic relevance. In accordance with the ping-pong kinetic mechanism, NADH release occurs before the transthioesterification step. This rules out the requirement for a flip of the NMNH for CoA binding, an assertion that is further supported by our recent kinetic data showing that the NAD(H) and CoA binding sites do not overlap (23). An alternative explanation is that nucleophilic attack of the CoA on the decarboxylated thioacylzyme intermediate is not possible if NMNH is present in the active site due to potential steric hindrance. Nevertheless, this hypothesis requires additional structural data to be validated, in particular characterization of the CoA binding site. As the putative structural dynamics associated with the NMN(H) moiety did not provide any clues as to the molecular basis responsible for the early release of the reduced cofactor in the catalytic mechanism of the MSDH, we investigated the possibility that this difference could originate from significant disparities in the adenosine binding mode.

Adenosine Binding Site—Superimposition of all available ALDH holo-structures revealed that the adenine ring is substantially more solvent-exposed in MSDH (Fig. 1). Analysis of the adenine binding pocket highlighted several structural factors that could explain this marked difference. The adenine ring fits between the N-terminal parts of the α_F and α_G helices, making van der Waals contacts with the side chains of His-226 and Val-229 from α_F and of Val-249 from α_G, respectively (supplemental Fig. S4A). The Val-249 residue is well conserved in all ALDHs including MSDHs, but His-226 and Val-229 are MSDH-specific (supplemental Figs. S2 and S5). The presence of invariant Val-229 in MSDH reduces the depth of the binding pocket, thereby increasing the solvent exposure of the adenine ring. In hydrolytic ALDHs, this residue is replaced by a glycine or an alanine, whereas the residue corresponding to His-226 is quite variable (except for eukaryotes where a proline is preferentially observed) (supplemental Fig. S2). In addition, the residue corresponding to Gly-225 is also missing, an invariant feature in MSDH sequences (supplemental Fig. S5). It was thus tempting to postulate that the adenine binding mode plays a key role in the dynamics of the reduced cofactor during the MSDH catalytic cycle. To validate this assumption, we first attempted to improve the stabilization of the adenine ring through substi-

Cofactor Dynamics in ALDH Superfamily

TABLE 2

Kinetic parameters of the reactions catalyzed by wild-type and mutated MSDHs under steady-state conditions

Kinetic parameters were deduced from nonlinear regression of experimental data sets according to the Michaelis-Menten equation. All K_m values were determined at saturating concentrations of the other substrates, and k_{cat} values are expressed per active subunit (*i.e.* two active subunits per tetramer). The steady-state initial rates of the reaction of mutated MSDHs were measured at 30 °C in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.2) under similar conditions as those for the wild-type MSDH. Mutated MSDHs were preincubated with 2 mM NAD at 30 °C before making the kinetic measurements.

	K_m			k_{cat} s^{-1}	Rate-limiting step
	NAD ⁺	MMSA	CoA		
Wild type	2.3 ± 0.1	60 ± 10	120 ± 20	2.2 ± 0.2	Deacylation
V229G	0.57 ± 0.08	54 ± 7	234 ± 30	0.78 ± 0.03	Deacylation
::G225	0.69 ± 0.05	22 ± 4	151 ± 18	0.39 ± 0.01	Deacylation
V229G/::G225	0.15 ± 0.02	27 ± 4	63 ± 4	0.21 ± 0.01	Deacylation
V229G/H226P	0.66 ± 0.19	28 ± 6	119 ± 25	0.090 ± 0.007	Acylation
V229G/::G225/H226P	0.77 ± 0.10	21 ± 5	96 ± 23	0.020 ± 0.006	Acylation
V229G/::G225/Y252L/ V253I	9.44 ± 1.12	215 ± 43	497 ± 126	0.020 ± 0.007	Acylation

^a Data are from Ref. 22.

tution of glycine for Val-229 and insertion of glycine at position 225 (::G225). If our hypothesis was correct, we expected to observe a significant decrease in the rate constant (k_{off}) associated with the dissociation of NADH from the thioacylenzyme/NADH complex relative to wild-type MSDH.

For the wild-type MSDH-catalyzed reaction, the rate-limiting step was shown to be associated with β -decarboxylation within the deacylation step. It was also demonstrated that the β -decarboxylation of the thioacylenzyme intermediate occurs after NADH release and before transthioesterification (22). Therefore, before interpreting the steady-state kinetic data and the k_{off} values, it was necessary to establish whether the rate-limiting step was still associated with deacylation for the mutated MSDHs. Accordingly, fast kinetic experiments were carried out for all mutated MSDHs at 30 °C and pH 8.2 in the presence of saturating concentrations of NAD⁺ and MMSA under presteady-state conditions (*i.e.* in the absence of CoA).

Kinetic Properties of Mutated V229G, ::G225 and V229G/::G225 MSDHs—A burst magnitude of 2 mol of NADH/mol of tetramer was observed irrespective of the mutated MSDHs. These data indicate that all mutated MSDHs also exhibited half-site reactivity, as described for the wild type. More importantly, the k_{obs} values of 152, 94, and 173 s⁻¹ were 195-, 241-, and 824-fold higher than the k_{cat} values for the V229G, ::G225 and V229G/::G225 MSDHs, respectively. This result shows that the rate-limiting step still takes place after hydride transfer. Its efficiency remains high but is significantly decreased, as the k_{obs} values are 7- to 13-fold lower relative to wild-type MSDH. This drop in rate constant could be the consequence of minor changes occurring in the location and orientation of the nicotinamide relative to the hemithioacetal intermediate within the mutated ternary complexes, thereby slowing down hydride transfer. One possible explanation is that modifications in the adenine binding pocket initiated a cascade of structural changes that disturbed the nicotinamide positioning within the covalent ternary complex. Interestingly, this hypothesis is supported by the recent work of Tsybovsky and Krupenko (40), who proposed that long-range communication between the active site and the cofactor binding domain in ALDH1L1, involving an α -helix (α_G) that forms one-half of the adenine binding pocket, partly controls the binding of the cofactor.

The kinetic parameters determined at pH 8.2 and 30 °C under steady-state conditions are summarized in Table 2.

Whereas the K_m values determined for MMSA and CoA were not significantly modified, the k_{cat} and K_m values for NAD⁺ decreased from 2.8- to 10.5-fold and from 3- to 15-fold for mutated MSDHs, respectively. However, it is not possible to interpret with confidence the significance of the decrease in K_m for NAD observed for mutated MSDHs as the K_m cannot be equated with the dissociation constant of the enzyme-substrate complex(es).

As previously mentioned, the rate-limiting step still occurs after hydride transfer. It was thus possible to evaluate the consequence(s) of the mutations introduced in the adenine pocket on the rate constant of NADH dissociation from the thioacylenzyme-NADH complex through the use of LDH as an NADH-trapping system. The experiments were performed at pH 8.2 and 30 °C under presteady-state conditions in the absence of CoA. The resulting progress curves were fit to a biphasic expression; the first kinetic phase represents the burst of NADH production associated with the acylation process, whereas the second corresponds to the titration by LDH of NADH that dissociates from the thioacylenzyme-NADH complex. Under the experimental conditions used, the rate constant associated with the NADH oxidation by LDH (130 s⁻¹) is higher than the apparent rate constants (k_{off}) of 2.7, 1, and 1 s⁻¹, which can be assigned to release of NADH from the thioacylenzyme-NADH complex for the V229G, ::G225 and V229G/::G225 MSDHs, respectively (Fig. 2). This result shows that NADH release still occurs before CoA adds, as for the wild-type MSDH (22). This is further supported by additional experiments done in the presence of Desulfo-CoA which show that for V229G/::G225 MSDH, the binding of this inactive analog impedes NADH release (supplemental Fig. S6). This conclusion can reasonably be extended to V229G and ::G225 MSDHs. The fact that the k_{off} are 20- and 56-fold lower than that determined for wild-type MSDH (56 s⁻¹ (22)) provides strong experimental support for a key role of the adenine binding mode in the dynamics of the reduced cofactor in the MSDH catalytic pathway.

For V229G MSDH, the 20-fold decrease in k_{off} for NADH likely reflects a movement of the adenine ring into the void created by the absence of steric hindrance at position 229; this relocation allows for a significant improvement in adenine stabilization through additional contacts within the binding pocket. The explanation is different for ::G225 MSDH because

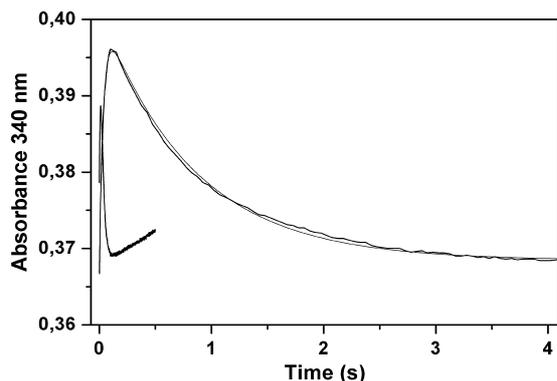


FIGURE 2. Representative transient for the determination of the NADH dissociation rate from the V229G::G225 thioacylenzyme intermediate. A solution of 32 μM "activated"-MSDH, 32 μM LDH (expressed in subunit), and 20 mM pyruvate was rapidly mixed at 30 °C with an equal volume of 2 mM NAD^+ and 0.5 mM MMSA (final concentrations). Both syringes contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.2). Under the same experimental conditions, the rate of oxidation of free NADH by LDH was shown to be 130 s^{-1} . The collected data were fit to a triphasic or biphasic expression for the wild-type (thick line, (22)) and V229G::G225 (thin line) MSDHs, respectively. The first phase represents the acylation step, and the second phase represents the consumption of NADH after its release from the thioacylenzyme-NADH complex, whereas the third phase observed for the wild-type MSDH is likely due to the reverse LDH-catalyzed reaction. For the V229G::G225 MSDH, the rate constants obtained for the global fitting are 29 ± 1 and $1.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, respectively. The burst of NADH appears smaller for the wild-type enzyme because the rate constants associated with the two phases are very similar (72 versus 56 s^{-1}) compared with those determined for the mutated MSDH.

this insertion instead increased the length of the loop located at the N-terminal end of the α_{F} helix. Thus, it is reasonable to postulate that the 56-fold decrease in k_{off} for NADH results from a conformational change(s) of this loop that might provide a supplemental anchor point(s) that improves the stabilization of the adenine ring. However, although each single mutation led to significant kinetic effects, they were not additive, as no additional decrease in k_{off} was observed for the double mutant. Finally, the fact that the k_{off} values are only 2.5- to 5-fold higher than the k_{cat} values shows that β -decarboxylation likely remains rate-limiting irrespective of the mutated MSDHs. Nonetheless, the decrease in k_{cat} compared with the wild-type MSDH is mainly the consequence of the significant decrease in the k_{off} values. Therefore, NADH release can be considered to be partially rate-limiting.

Kinetic Properties of Mutated V229G/H226P, V229G::G225/H226P, and V229G::G225/Y252L/V253I MSDHs—In an attempt to make NADH release rate-limiting, we tried to further stabilize the adenine ring by combining new point mutations with V229G and ::G225. As mentioned above, the data obtained on ::G225 MSDH highlight the fact that mutations altering the conformation of the loop located at the entrance of the binding pocket can lead to improved stabilization of the adenine ring. To validate this assumption, a proline was introduced at position 226 in the V229G and V229G::G225 MSDHs. Substitution of a proline for His-226 mimics the molecular context of many hydrolytic ALDHs and introduces strong geometrical constraints that should modify the conformation of this loop. Therefore, we anticipated that the H226P substitution would induce a closure, even minor, of this loop on the adenine ring. On the other hand, introduction of residues with higher hydrophobic character, such as Leu and Ile, at positions 252 and 253

(α_{G} helix, supplemental Fig. S4) in V229G::G225 MSDH, would potentially increase the number of van der Waals contacts between adenine and the bottom face of the binding pocket.

The steady-state kinetic parameters determined at pH 8.2 and 30 °C are summarized in Table 2. The k_{cat} values decreased from 24- to 110-fold. More importantly, the fact that no burst of NADH production was observed under pre-steady-state conditions shows that acylation is now rate-limiting irrespective of the mutated MSDH (this result precludes comparison of the obtained K_{m} values with those determined for the wild type). As mentioned in the Introduction, the rate constant associated with the acylation step is high for the wild-type ($k_{\text{ac}} > 1000 \text{ s}^{-1}$). Therefore, the k_{ac} values are at least 1.1×10^4 - to 5×10^4 -fold lower for the mutated MSDHs. These drastic kinetic effects are likely the consequence of significant changes in the positioning of the nicotinamide ring relative to the hemithioacetal intermediate that prevent an efficient hydride transfer. Because the mutations should modify the positioning or mode of stabilization of the adenine, it is tempting to propose that changes occurring in this binding pocket can propagate to the nicotinamide ring. Although this hypothesis remains to be validated, our data clearly indicate that the cofactor binding mode is optimized in MSDH with a fine balance between the requirement for positioning of the nicotinamide ring to allow efficient hydride transfer and a degree of conformational flexibility for the deacylation to occur. Any perturbation, even minor, appears to be deleterious with respect to the efficiency of the MSDH-catalyzed reaction. The model seems to hold for the hydrolytic ALDHs. Indeed, our attempts to accelerate the rate of NADH release through "destabilization" of the adenine ring failed for retinal dehydrogenase 2 (RALDH2). The NMN moiety is known to be less stabilized in this ALDH family, at least within the ALDH/NAD(P) binary complex. Therefore, if the main anchor point (*i.e.* the adenine ring) is weakened, it is likely that the positioning of the NMN moiety within the covalent ternary complex is compromised, explaining why in the $\Delta\text{G225/G229V}$ RALDH2 acylation becomes rate-limiting with a 300-fold reduced k_{ac} (data not shown).

Conclusion—Structural dynamics associated with cofactor binding are known to play key roles in the chemical mechanism of the hydrolytic ALDHs. In this study we propose that this is also the case for their CoA-dependent counterparts. Indeed, a flip of the NMNH away from the active site is also possible in MSDH and likely the entire CoA-dependent family. This isomerization step might be required to permit nucleophilic attack of the CoA on the decarboxylated thioacylenzyme. However, in contrast to what has been established for hydrolytic ALDHs, the flip of the NMNH away from the active site leads to the complete release of NADH. Our data show that weaker stabilization of the adenine ring is a key factor in triggering the early NADH release in the MSDH-catalyzed reaction and provide for the first time structural insights into the mechanism whereby the cofactor binding mode is responsible, at least in part, for the different kinetic behaviors of the hydrolytic and CoA-dependent ALDHs. From similar three-dimensional structures, evolution has thus produced slightly different modes of cofactor binding within the ALDH superfamily. Over-

Cofactor Dynamics in ALDH Superfamily

all stabilization of the cofactor results from differential contributions of both binding subsites of the cofactor; that is, mainly interactions with the adenine moiety for the hydrolytic ALDHs and the nicotinamide for the CoA-dependent ALDHs. However, in both cases the nicotinamide ring is properly positioned in the ternary complex to allow an efficient hydride transfer during the acylation step, whereas differences in the stabilization of the adenine ring lead to early or late release of the reduced cofactor.

Acknowledgments—We gratefully thank S. Boutserin for very efficient technical help and Dr. C. Stines-Chaumeil for providing the wild-type MSDH used in the crystallographic studies. We also thank Pr. K. Weissman for careful reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., and Vasiliou, V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes. The aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 697–720
2. Vasiliou, V., Pappa, A., and Estey, T. (2004) Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab. Rev.* **36**, 279–299
3. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., and Dontu, G. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567
4. Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S., and Boman, B. M. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* **69**, 3382–3389
5. Wang, X., and Weiner, H. (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 237–243
6. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **300**, 141–152
7. D'Ambrosio, K., Pailot, A., Talfournier, F., Didierjean, C., Benedetti, E., Aubry, A., Branlant, G., and Corbier, C. (2006) The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family. New coenzyme conformation and relevance to catalysis. *Biochemistry* **45**, 2978–2986
8. Farrés, J., Wang, T. T., Cunningham, S. J., and Weiner, H. (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 2592–2598
9. Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., and Wang, B. C. (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317–326
10. Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., and Díaz-Sánchez, A. G. (2011) Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. *Chem. Biol. Interact.* **191**, 137–146
11. Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T. D. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. The genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701–711
12. Talfournier, F., Pailot, A., Stinès-Chaumeil, C., and Branlant, G. (2009) Stabilization and conformational isomerization of the cofactor during the catalysis in hydrolytic ALDHs. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 79–83
13. Vedadi, M., and Meighen, E. (1997) Critical glutamic acid residues affecting the mechanism and nucleotide specificity of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **246**, 698–704
14. Marchal, S., and Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* **38**, 12950–12958
15. Rahuel-Clermont, S., Arutyunov, D., Marchal, S., Orlov, V., Muronetz, V., and Branlant, G. (2005) Thermal destabilization of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* upon phosphate binding in the active site. *J. Biol. Chem.* **280**, 18590–18597
16. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (1999) Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **290**, 161–173
17. Hammen, P. K., Allali-Hassani, A., Hallenga, K., Hurley, T. D., and Weiner, H. (2002) Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **41**, 7156–7168
18. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., and Eklund, H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 2106–2117
19. Ni, L., Sheikh, S., and Weiner, H. (1997) Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 18823–18826
20. Pailot, A., D'Ambrosio, K., Corbier, C., Talfournier, F., and Branlant, G. (2006) Invariant Thr-244 is essential for the efficient acylation step of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochem. J.* **400**, 521–530
21. Perez-Miller, S. J., and Hurley, T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100–7109
22. Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F., and Branlant, G. (2006) Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **395**, 107–115
23. Talfournier, F., Stines-Chaumeil, C., and Branlant, G. (2011) Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Substrate specificity and coenzyme A binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 21971–21981
24. Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T., and Fujita, Y. (1997) Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 4591–4598
25. Goodwin, G. W., Rougraff, P. M., Davis, E. J., and Harris, R. A. (1989) Purification and characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase from rat liver. Identity to malonate semialdehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 14965–14971
26. Chambliss, K. L., Gray, R. G., Rylance, G., Pollitt, R. J., and Gibson, K. M. (2000) Molecular characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**, 497–504
27. Gray, R. G., Pollitt, R. J., and Webley, J. (1987) Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency. Demonstration of defective valine and β -alanine metabolism and reduced malonic semialdehyde dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **38**, 121–124
28. Sass, J. O., Walter, M., Shield, J. P., Atherton, A. M., Garg, U., Scott, D., Woods, C. G., and Smith, L. D. (2012) 3-Hydroxyisobutyrate aciduria and mutations in the ALDH6A1 gene coding for methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 437–442
29. Shone, C. C., and Fromm, H. J. (1981) Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20**, 7494–7501
30. Söhling, B., and Gottschalk, G. (1993) Purification and characterization of a coenzyme A-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* **212**, 121–127
31. Kupiecki, F. P., and Coon, M. J. (1960) Methylmalonic semialdehyde. *Biochem. Prep.* **7**, 69–71
32. Dubourg, H., Stines-Chaumeil, C., Didierjean, C., Talfournier, F., Rahuel-Clermont, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2004) Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1435–1437

Cofactor Dynamics in ALDH Superfamily

33. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291
34. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography and NMR system. A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921
35. Roussel, P. A., and Cambillau, C. (1991) *TURBO-FRODO, Silicon Graphics Applications Directory*, Silicon Graphics, Mountain View, CA
36. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2256–2268
37. González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A., and Horjales, E. (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* **385**, 542–557
38. Hurley, T. D., Perez-Miller, S., and Breen, H. (2001) Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* **130**, 3–14
39. Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., and Baker, E. N. (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. The structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**, 1541–1551
40. Tsybovsky, Y., and Krupenko, S. A. (2011) Conserved catalytic residues of the ALDH1L1 aldehyde dehydrogenase domain control binding and discharging of the coenzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 23357–23367
41. Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1995) LIGPLOT. A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**, 127–134

SUPPLEMENTARY DATA

S1 Stereoview of NAD in MSDH from *B. subtilis*. The $2|Fo|-|Fc|$ (1σ) electron density map of NAD is shown in blue and the NAD molecule is shown in a yellow stick model.

S2 Multi-sequence alignment of MSDH from *B. subtilis* and selected ALDHs: class 2 aldehyde dehydrogenase (ALDH2) from bovine liver (accession code lag8); retinaldehyde dehydrogenase type II (RalDH2) from Norway rat (accession code 1bi9); non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) from *Streptococcus mutans* (accession code 1euh). Structural alignment was performed using Strap (42). The secondary structural elements of ALDH2 and MSDH are shown at the top and bottom of the alignment, respectively. The figure was prepared with ESPript.31(43).

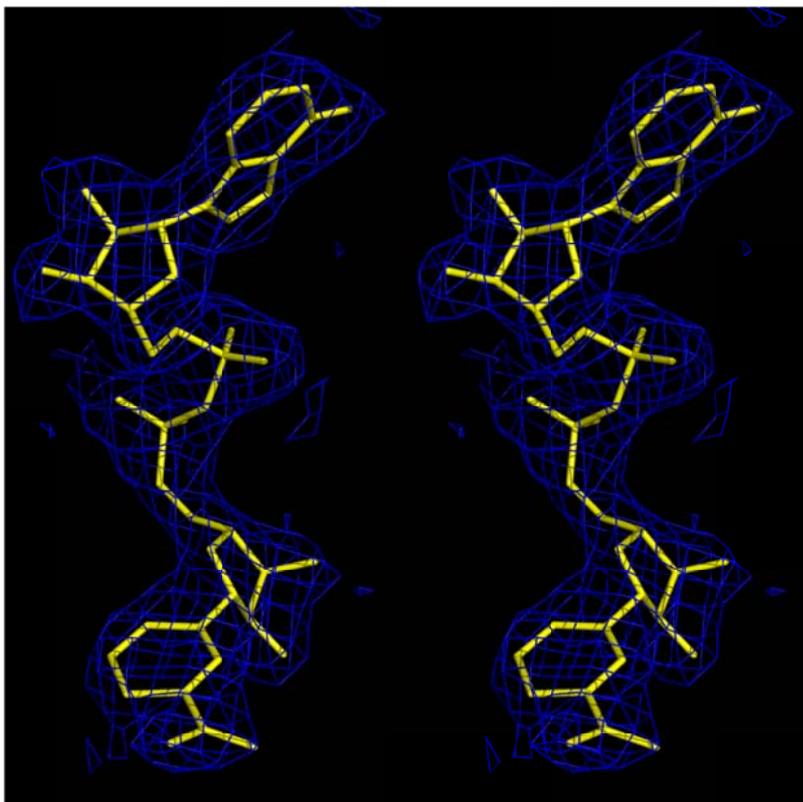
S3 Superimposition of the hydrophobic pocket postulated to act as the exit door for the reduced cofactor after isomerization. The residues from the MSDH pocket are labeled and colored by atom type. The corresponding residues from GAPN are colored yellow and are not labeled for clarity. In GAPN the pocket consists of residues Phe168, Ser246-Thr247-Gly248-Ile249, Gly270, Ile345, Asp346, Lys348, Ser349, Tyr352, Glu399-Pro400-Phe401, and Tyr425. The figure was prepared using Pymol 0.99 (www.pymol.org).

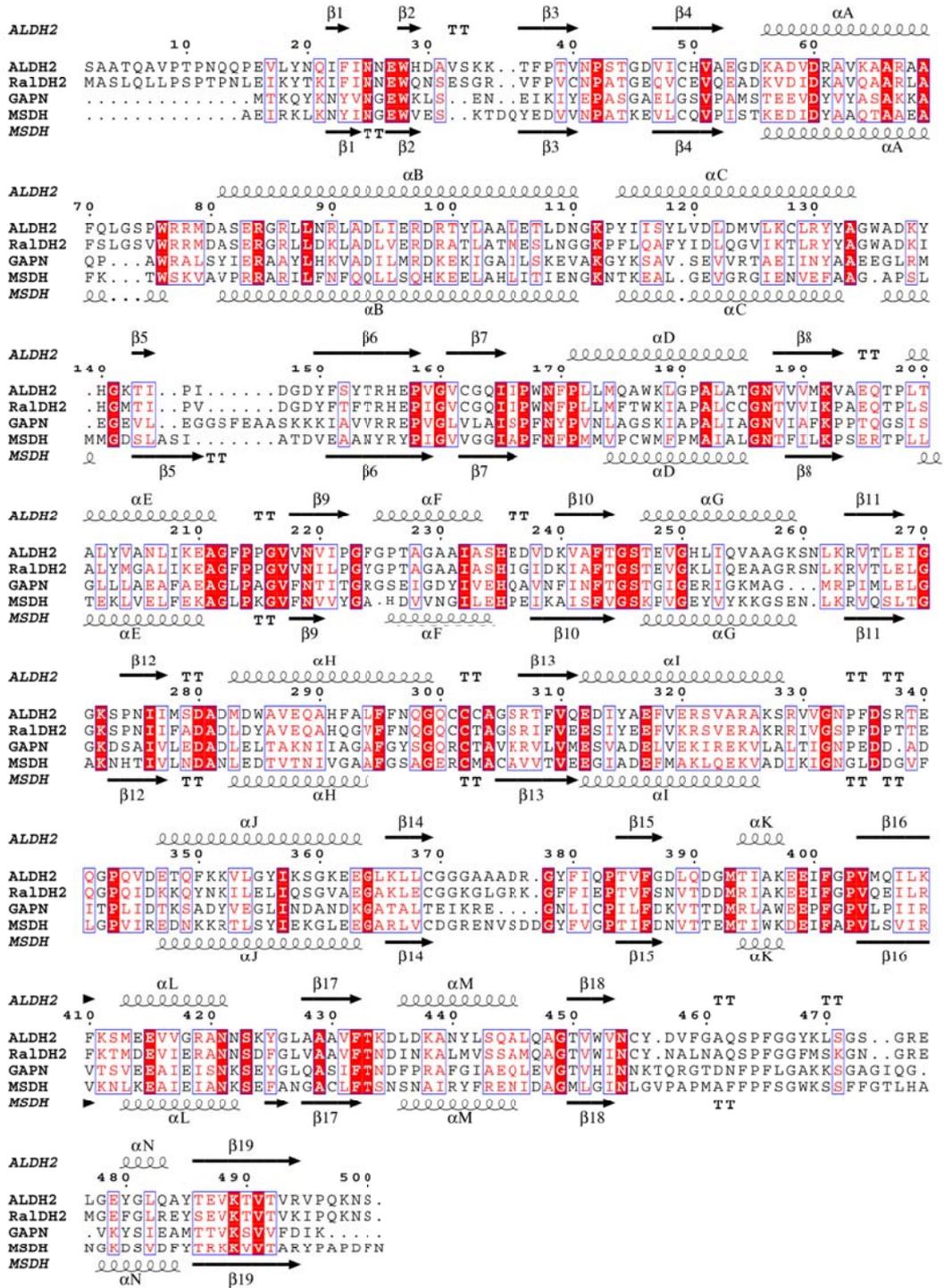
S4 The adenine binding site of (A) MSDH from *B. subtilis* and (B) rat RalDH2. The secondary structure elements contributing to the site are represented as ribbons. NAD is shown in the stick representation colored by atom type. Residues from the α_F and α_G helices that have been mutated in this study appear as sticks and are colored by atom type. The figure was prepared using Pymol 0.99 (www.pymol.org).

S5 Sequence alignment of the regions covering the adenine binding pocket in MSDHs and comparison with the hydrolytic human ALDH2. The sequence alignment includes MSDHs whose activity has been demonstrated (indicated by star). Sequence alignment was performed with the BioEdit software, and the numbering of amino acid residues is according to Wang and Weiner (5). The two positions shown as critical for adenine stabilization/NADH release, Val229 and the absence of Gly225, which are invariant features, are highlighted in red. Regarding the other positions studied, which are in blue, an His residue is mainly found at position 226, the hydrophobic character of the residue 253 is conserved through the presence of an isoleucine or a valine, whereas tyrosine or histidine residues are found at position 252.

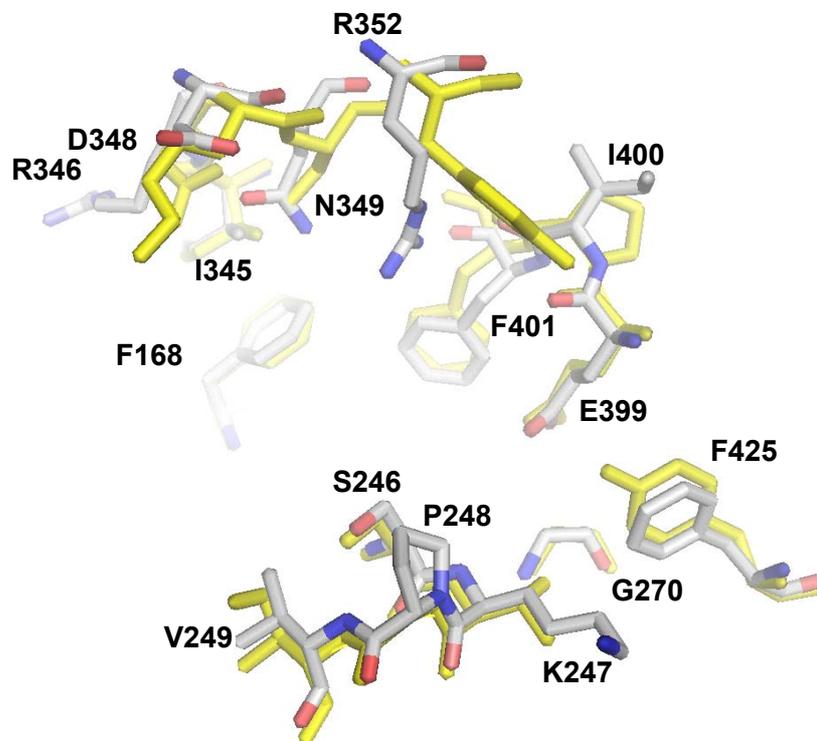
S6 Representative transient for the determination of the Desulfo-CoA impact on the NADH release from the V229G/::G225 thioacylenzyme intermediate. A solution of 30 μ N 'activated'-MSDH, 30 μ N LDH (expressed in subunit) and 20 mM pyruvate was rapidly mixed at 30 °C with an equal volume of 2 mM NAD and 0.5 mM MMSA (final concentrations) in the absence (black line) or the presence (blue line) of 0.25 mM desulfo-CoA. Both syringes contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2. The collected data were fit to a biphasic expression. The presence of desulfo-CoA led to a 2-fold decrease of the burst of NADH production and a 4-fold decrease of the amount of NADH released.

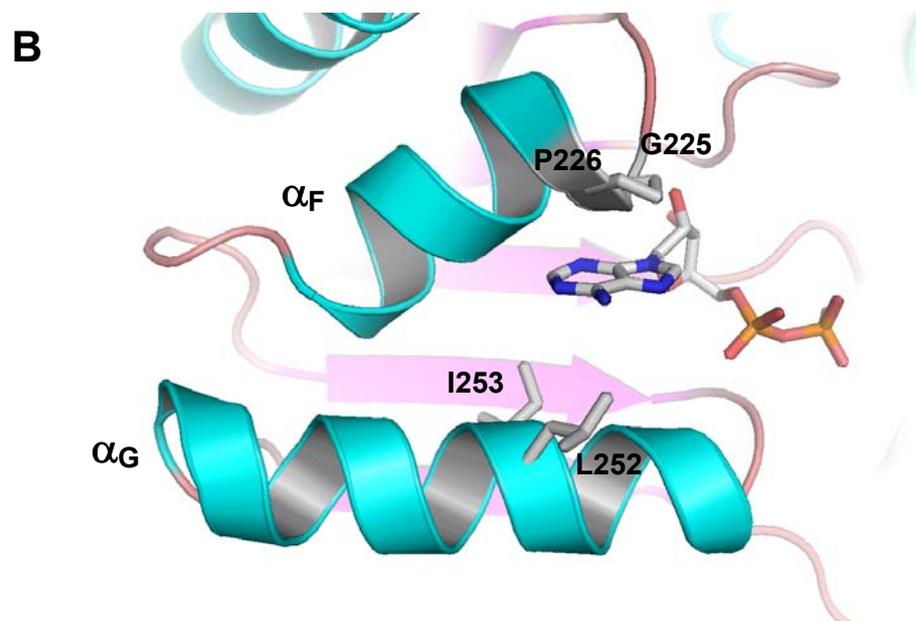
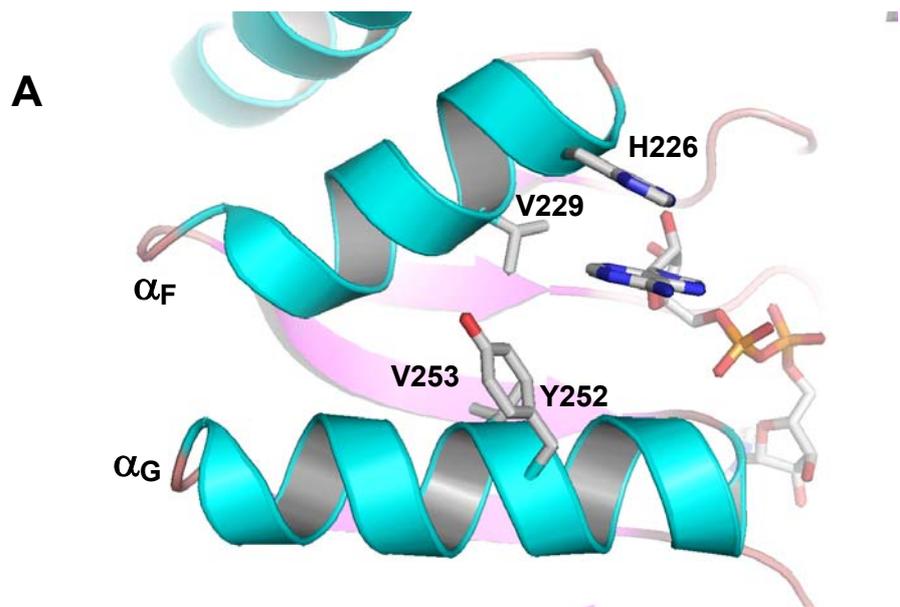
S1





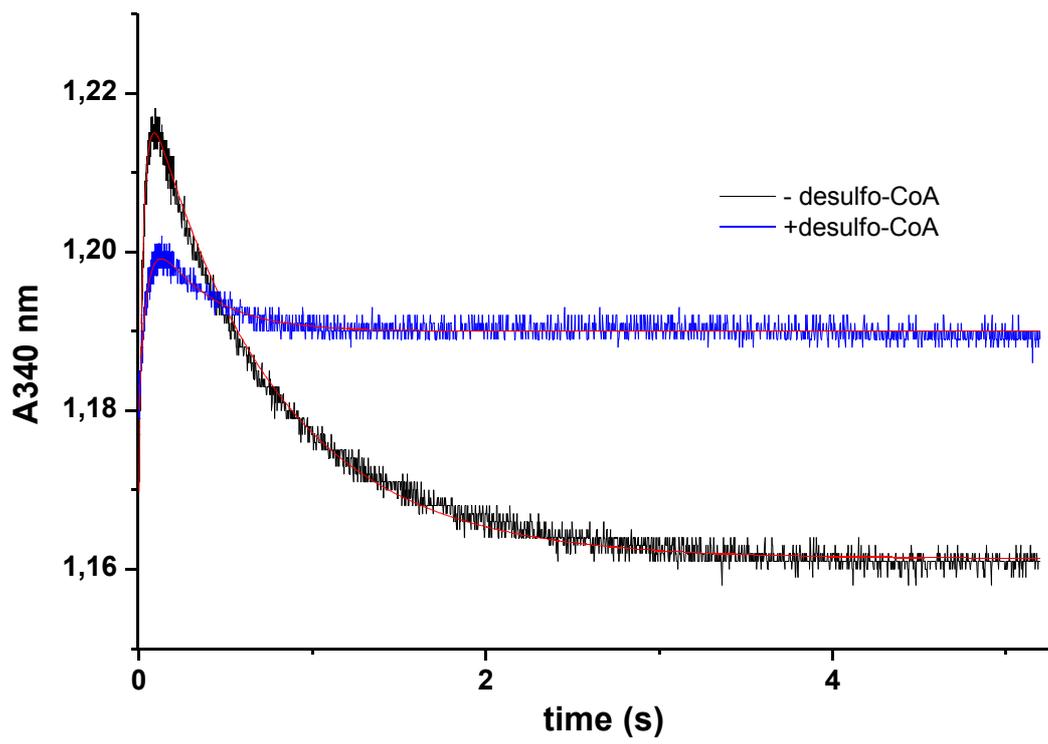
S3





S5

	200	210	220	230	240	250	260
<i>ALDH2 Homo sapiens</i>	TALYVANLIKEAGFP	PGVNVNIPGFC	PTAGAAIASHEDV	DKVAFTGSTE	VGHLIQVAAGKSNL	KRV	T
<i>Bacillus subtilis*</i>	LTEKLVLEFKEAGL	PKGVFNIVVYGA	-HDVV	NGILEHPEIKAIS	SFVGSKPVGE	YVYK	-GSENLKR
<i>Acetobacter aceti</i>	ASVMLAEIFKEAGL	PDGVLQVVHGD	-KDMV	NAILEHPEIKAVS	FPVGS	TPIAKH	VYAT-GTAHGKRV
<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	STMLLVELAIEAGI	PAGVLNVVHGG	-KDV	VDGLCTHKDIKAVS	FPVGS	TAVGTH	VYDL-AGKHGKRV
<i>Brucella melitensis*</i>	VPMRLAELFQEAGL	PAGIFNVVNGD	-KESV	DALLDDPDVQAIG	FPVGS	TPIAQY	IYGR-GCANGKRV
<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	TSVRLAELFLEAGL	PKGVLVVHGG	-KEQV	DQLLKHQVKAIS	FPVGS	VAVGQY	VYHT-GTAHNKRV
<i>Streptomyces coelicolor*</i>	AAVKVAELLSEAGL	PDGVFNIVHGD	-KVAV	DRLLEHPDVKAIS	FPVGS	TPIARI	YIHTT-ASANGKRV
<i>Listeria innocua</i>	LMEKLVLEFSEAGL	PKGVFNIVVYGA	-HDVV	NGILENETIKAVS	FPVGS	PKVGE	YVYKT-GSANLKR
<i>Listeria monocytogenes</i>	LMEKLVLEFSEAGL	PKGVFNIVVYGA	-HDVV	NGILENEIKAVS	FPVGS	PKVGE	YVYKT-GSANLKR
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	TSQRLVLEFQEAGL	PDGVLNIVNGA	-VDVV	NGLLDHPDVKAIS	FPVGS	QVAVG	YVYK-GSDHLKRV
<i>Bacillus megaterium</i>	LAARLAELEFEEAGL	PKGVNIVNGA	-HDVV	NGLLEHKLVKAI	SFVGS	QPVAE	YVYK-GTENLKR
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMEKIVLEIEEAGL	PSGVFNIVVYGA	-HDVV	NTLLRDLVKGIS	FPVGS	SKNVGE	YVYK-GTRNLKR
<i>Sporosarcina newyorkensis</i>	LANRLAELLKEAGL	PDGVFNIIHGA	-HDI	VNGMLGHPDIPAI	SFVGS	QPVAE	YVYRT-GTANGKRV
<i>Geobacillus thermoglucosid</i>	LANRLAELFTEAGL	PAGVLNIVHGA	-HDVV	NGILEHKDIKAVS	FPVGS	QPVAE	YVYK-AAAHGKRV
<i>Caldalkalibacillus thermar</i>	LANRLAELFQEAGL	PEGVLNIVHGA	-HDVV	NGLLEHPDIKAI	SFVGS	QPVAE	YVYK-AAAHGKRV
<i>Penicillium chrysogenum</i>	AAMILAEELAKEAG	FPGVNIIHGT	-APT	VDFILDEPAIKAI	SFVGS	NRAGE	YIYSR-GSANGKRV
<i>Candida albicans</i>	AAMIICELAAKAGV	PAGVLNIVHGT	-HDT	VNKLIDDPRIKAI	TFVGG	KAGK	YIYER-GSQLGKRV
<i>Aspergillus nidulans</i>	AAMILAEELAREAG	FPGVNIIHGS	-AKT	VDFILDAPEIKAI	SFVGS	NRAGE	YIYTR-GSANGKRV
<i>Oryza sativa</i>	AAMMLAEELAMEAGL	PKGVNIVHGT	-HDVV	NNICDDEDIKAVS	FPVGS	NIAGM	HIYSR-ASAKGKRV
<i>Populus trichocarpa</i>	ASIIILAEELAMEAGL	PNGVLNIVHGT	-NDI	VNAICDDDIRAIS	SFVGS	NTAGM	HIYSR-ASAKGKRV
<i>Zea mays</i>	AAMMLAEELAMEAGL	PKGVNIVHGT	-NDVV	NNICDDEDIKAVS	FPVGS	NTAGM	HIYSR-ASAAGKRV
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAVMLADLAQQAGL	PKGVNIVQGS	-RDVV	NWICDDPAIRAIS	SFVGS	DSAGK	YIYAR-GCAAGKRV
<i>Medicago truncatula</i>	ASMLLSQLAMEAGL	PEGVLNIVHGA	-HDT	VNAICDHDIDIKAI	SFVGS	SNVAGM	HIYAR-AAAKGKRV
<i>Sorghum bicolor</i>	AAMMLAEELAMEAGL	PKGVNIVHGT	-NDVV	NNICDDEDIKAVS	FPVGS	NTAGM	HIYSR-ASAAGKRV
<i>Caenorhabditis elegans</i>	AAQLLVELAKEAGV	PDGCVNIIHGQ	-HSA	VNFICDNPDIKAI	SFVGS	DAAGK	HIYER-GAKNGKRV
<i>Dictyostelium discoideum</i>	ASMFLVQLAQEAGV	PDGVNIVHGG	-KEAV	NFICDAPEVRAIS	FPVGS	ADQAGR	HIHAR-GTANGKRV
<i>Xenopus laevis</i>	ATMLLAQLMQDAGV	PDGTLNIIHGQ	-HAA	VNFVCDHPAIRAIS	FPVGS	SNQAGE	YIYER-GSRNGKRV
<i>Danio rerio</i>	CTMMLAKLLQDAG	PDGTLNIIHGQ	-HDA	VNFICDHPAIRAIS	FPVGS	SNQAGE	YIYER-GSKNGKRV
<i>Drosophila melanogaster</i>	ATMLLMELLNEAGC	PPGVNIVHGG	-HDA	VNFICDAPEIKAVS	FPVGS	DQAGK	YIYER-AGKNGKRV
<i>Gallus gallus</i>	ALMFLAKLFQDAG	PDGTLNIIHGQ	-HEA	VNFICDHPDIRAIS	FPVGS	SNQAGE	YIYER-GSRNGKRV
<i>Rattus norvegicus*</i>	ATMLLAKLLQDSG	ADGTLNIIHGQ	-HEA	VNFICDHPDIKAI	SFVGS	SNQAGE	YIFER-GSRNGKRV
<i>Bos taurus</i>	ATMLLAKLFQDSG	ADGTLNIIHGQ	-HEA	VNFICDHPDIKAI	SFVGS	SNQAGE	YIFER-GSRHGKRV
<i>Homo sapiens*</i>	ATMLLAKLLQDSG	ADGTLNIIHGQ	-HEA	VNFICDHPDIKAI	SFVGS	SNKAGE	YIFER-GSRHGKRV



*Discussion
et perspectives*

Mode de reconnaissance du rétinol par les RALDH : importance d'une réorganisation conformationnelle

Par rapport à ce qui avait été proposé dans la littérature, deux résultats originaux émergent de cette étude. D'une part, nous avons montré que la réaction de biosynthèse de l'acide rétinoïque catalysée par les RALDH1 et 2 est contrôlée par l'étape de reconnaissance du rétinol, et d'autre part, que le mécanisme de reconnaissance comprend au moins deux étapes : une étape de liaison, et une étape de réorganisation conformationnelle qui s'est avérée être cinétiquement limitante.

L'intérêt de ce travail réside également dans la mise au point de méthodes cinétiques permettant de décomposer ce mécanisme et d'accéder aux constantes de vitesse associées à ces deux étapes. En effet, comme le montrent les résultats préliminaires obtenus pour les mutants de la RALDH1, les valeurs de K_D déterminées pour le rétinol ne sont pas corrélées aux variations de k_{cat} observées. Il est donc probable que des mutations dans le site actif peuvent affecter l'étape de réorganisation conformationnelle qui est indispensable à la formation d'un complexe michaélien efficace. Dans ce cadre, l'utilisation d'une méthode cinétique reposant sur un signal spectroscopique de type FRET, très sensible aux variations d'orientation/distance entre l'analogue de substrat rétinol et la sonde que constitue le Trp177 dans le site actif, est pertinente. La mise au point de cette méthodologie jette donc les bases permettant d'étudier le rôle de résidus du site actif dans le processus de reconnaissance du rétinol à deux étapes, comme par exemple le résidu Tyr296. En effet, la substitution Y296V conduit à une diminution d'un facteur 9 du k_{cat} . Dans l'hypothèse où l'étape limitante de la réaction reste associée au changement conformationnel nécessaire à la formation d'un complexe enzyme/NAD/rétinol compétent, ce résultat suggère que la position 296 participe à ce processus directement ou indirectement.

Cependant, l'examen de la structure cristalline du complexe RALDH1/NAD (Moore *et al.*, 1998) ne permet pas d'identifier les bases moléculaires responsables de ce mode de reconnaissance, en particulier les résidus potentiellement impliqués dans la réorganisation conformationnelle. Par contre, sur la base de la structure du complexe RALDH2/NAD, il a été proposé que les mouvements de la boucle 462-477 localisée dans le tunnel d'accès du substrat étaient intimement liés à sa reconnaissance (Lamb et Newcomer, 1999, § 2.3.3.1 p. 34). Dans les deux cas, une approche par modélisation et dynamique moléculaire pourrait conduire à proposer un scénario complet de ce mécanisme et à identifier les positions clé contrôlant ce mode de reconnaissance, qui s'apparente à un mécanisme "induced-fit". Il est important de noter que ces positions peuvent être situées dans le site actif mais également à distance dans la structure. Les hypothèses issues de cette approche *in silico* pourraient ensuite être affinées/validées en associant l'ingénierie protéique aux méthodes développées au cours de ma thèse. Une approche complémentaire consisterait à obtenir la structure

Discussion-Perspectives

d'un intermédiaire covalent thioacylenzyme (l'accumulation d'un tel intermédiaire serait rendue possible par l'utilisation du mutant E268A pour lequel l'étape d'hydrolyse est très ralentie) qui permettrait de définir précisément l'environnement du rétinol au sein d'un complexe catalytiquement représentatif. En effet, des essais de cristallisation effectués dans l'équipe par A. Gruez sur un complexe ternaire non covalent RALDH2/NAD/rétinol inactif, se sont révélés infructueux probablement en raison de la dynamique associée à la liaison du rétinol. Ce résultat suggérerait que, dans les conditions de cristallisation, l'équilibre associé au changement conformationnel ne serait déplacé vers le complexe catalytiquement compétent qu'après formation de la liaison covalente avec la Cys302 catalytique.

Le mode de reconnaissance du rétinol est-il le même pour la RALDH1 et la RALDH2 ? Notre étude utilisant une sonde de type FRET montre qu'un mécanisme similaire impliquant au moins deux étapes est mis en jeu comme en témoigne la nature biphasique des cinétiques obtenues. La phase rapide correspondrait à la liaison du rétinol dans le site actif et la seconde phase plus lente à la transition conformationnelle. Dans la structure de la RALDH1, la boucle 462-477 (figure 39) adopte une conformation définie, alors qu'elle est très flexible dans la structure de la RALDH2. Ceci pourrait expliquer le fait que l'amplitude de cette seconde phase est plus importante dans le cas de RALDH2. En d'autres termes, il est raisonnable d'envisager une transition ordonnée-ordonnée dans le cas de la RALDH1 et désordonnée-ordonnée dans le cas de la RALDH2. Par contre, la nature de cette transition ne serait pas l'élément essentiel déterminant la spécificité de ces enzymes pour le rétinol.

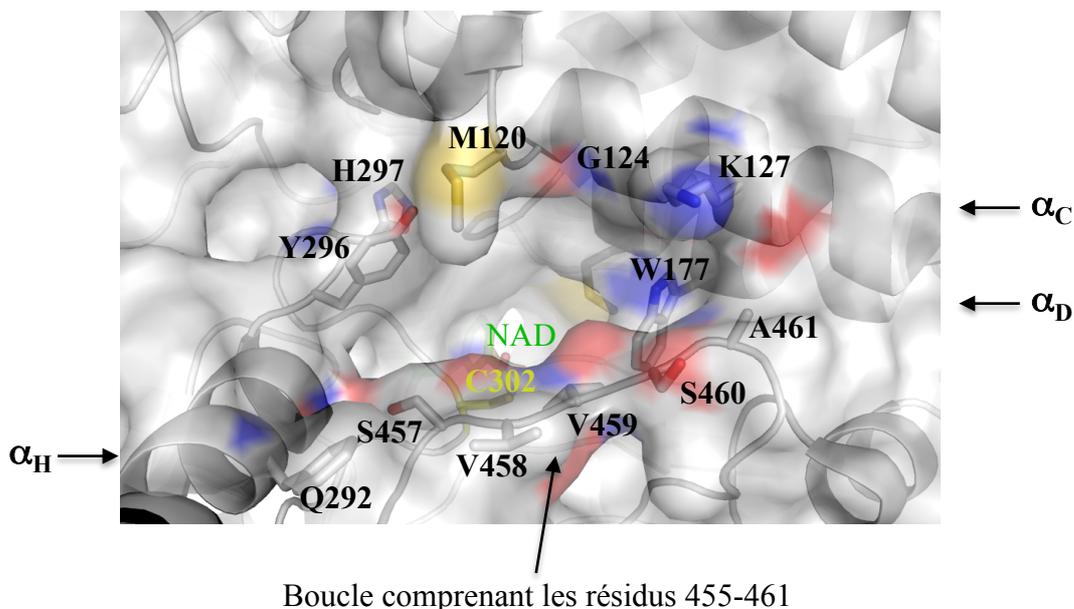


Figure 39 : Vue d'ensemble du canal d'accès du substrat dans la RALDH1 de mouton (code 1bxs, Moore *et al.*, 1998).

Plus globalement, le fait que la dynamique structurale associée à cette boucle soit impliquée dans la formation d'un complexe michaélien compétent avec le rétinol est à rapprocher de son rôle supposé dans la transmission du message conduisant à l'expression des propriétés de coopérativité dans d'autres ALDH. Alors que dans les RALDH, cette dynamique favoriserait la formation d'un complexe catalytiquement compétent, elle serait responsable des propriétés de coopérativité négative "extrême" (réactivité de demi-site) observées dans la MSDH et le variant asiatique de l'ALDH2 humaine (Stinès-Chaumeil, 2006 ; Larson *et al.*, 2005).

Dynamique conformationnelle du cofacteur au cours de la catalyse

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis l'identification d'un signal spectroscopique permettant la caractérisation cinétique de l'isomérisation du cofacteur réduit au cours de la catalyse pour la RALDH2. Nous avons montré que l'observation de ce signal est majoritairement associée à la présence du résidu Trp177, qui est conservé chez de nombreuses ALDH eucaryotes. L'utilisation du logiciel Dynafit pour réaliser un ajustement global des données expérimentales au modèle cinétique proposé s'est révélée pertinente et a permis d'assigner une valeur à la constante de vitesse intrinsèque associée à l'isomérisation du cofacteur réduit. Cette valeur d'environ 11 s^{-1} est similaire à celle déterminée pour la constante de vitesse intrinsèque associée à l'acylation (10 s^{-1}). Ce résultat indique que la formation du NADH est immédiatement suivie du processus d'isomérisation de la partie NMNH.

Restent maintenant à identifier les bases moléculaires qui permettent ce basculement dans les ALDH hydrolytiques. Un certain nombre d'hypothèses relatives à la nature des forces motrices favorisant ce basculement peuvent être émises, à savoir : la perte de l'interaction potentielle entre la charge négative de l'oxyanion de l'intermédiaire hémithioacétal et la charge positive du noyau nicotinamide du NAD(P) suite au transfert d'hydrure, ainsi que la non planéité du noyau dihydropyridine du NAD(P)H. De plus, l'examen de la structure cristalline du mutant C302R de la GAPN de *S. mutans* a mis évidence que la barrière énergétique existant entre les deux conformations majoritaires adoptées par le cofacteur au cours du cycle catalytique est sans doute faible (D'Ambrosio *et al.*, 2006). A partir de la structure du complexe binaire cristallin T244S GAPN/NADP il avait été proposé que la Thr244 pouvait jouer un rôle dans ce processus de basculement. En effet, l'absence du groupement $\beta\text{-CH}_3$ conduit à une conformation stabilisée de la portion NMN du cofacteur, clairement différente de celle supposée être adoptée dans le complexe ternaire covalent (ALDH/GAPN)/NAD(P)/thiohémicétal de l'enzyme sauvage (figure 40) (Pailot *et al.*, 2006). Par conséquent, l'existence de contacts de van der Waals entre ce groupement et le cycle

Discussion-Perspectives

nicotinamide pourrait favoriser une conformation métastable et participer à l'abaissement de la barrière énergétique. D'autre part, ces mêmes contacts pourraient générer des contraintes stériques avec la conformation non plane du nicotinamide réduit contribuant ainsi au mécanisme de basculement.

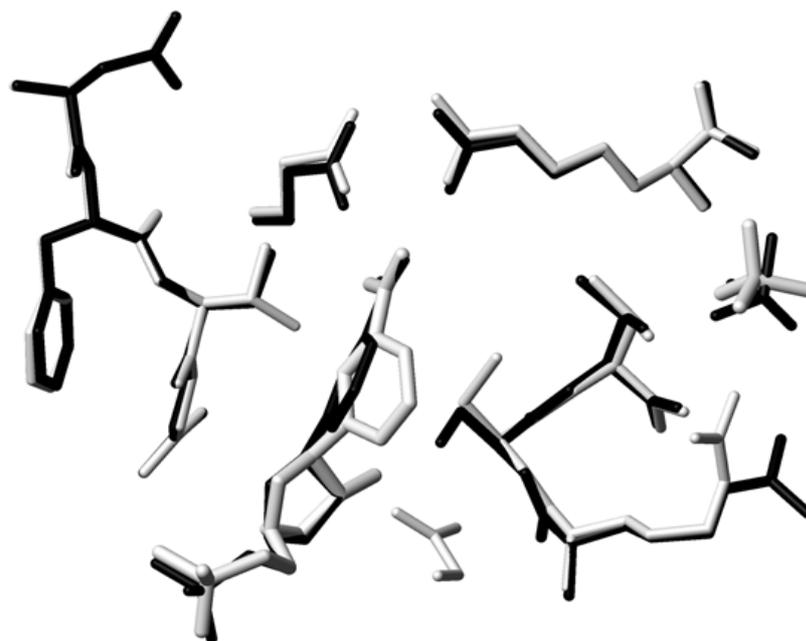


Figure 40 : Superposition des sites actifs des complexes binaires cristallins du type sauvage (en gris) et du mutant T244S (en noir).

La conformation de la partie NMN du cofacteur pour la structure cristalline du complexe binaire obtenu le type sauvage est celle décrite comme étant compatible avec un transfert d'hydrure efficace (Cobessi *et al.*, 1999 ; Perez-Miller et Hurley, 2003).

Plus généralement, il est évident que le mode de liaison particulier du cofacteur rencontré dans cette famille d'ALDH, notamment la faible stabilisation du pyrophosphate et de la partie NMN du cofacteur, est un facteur déterminant dans ce basculement. De plus, il est probable que des réorganisations conformationnelles accompagnent ce basculement et contrôlent la vitesse de ce processus, le rendant vraisemblablement irréversible pour permettre à la réaction d'hydrolyse de se faire. La comparaison des réseaux d'interactions NMN(H)/protéine dans les conformations adoptées pendant le transfert d'hydrure et après isomérisation révèle que la boucle portant les résidus invariants Glu399 et Phe401 participe probablement à cette réorganisation conformationnelle. En effet, leurs chaînes latérales établissent des interactions avec la partie nicotinamide-ribose dans les deux conformations (figure 41).

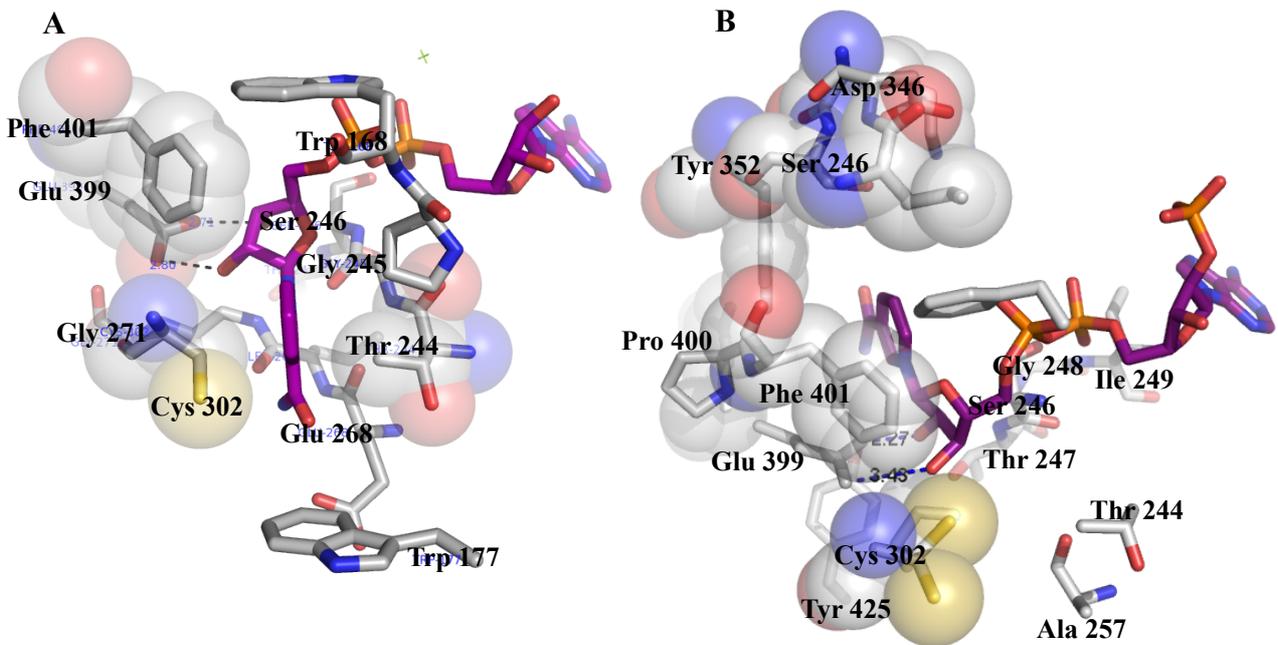


Figure 41 : Vue de la poche constituant le site de liaison de la partie NMNH du cofacteur.

A : Structure du complexe binaire de l'ALDH2 humaine avec le NAD (conformation transfert d'hydrure) (code pdb 1o00, Perez-Miller et Hurley, 2003), B : Structure de l'intermédiaire thioacyl-enzyme de GAPN E268A / NADPH / G3P (conformation après isomérisation de la partie NMNH du cofacteur) (code pdb 2qe0, D'Ambrosio *et al.*, 2006). Le cofacteur est représenté en violet.

L'utilisation de méthodes de modélisation et de dynamique moléculaire permettant de simuler le chemin emprunté par le cofacteur au cours de ce processus et les changements conformationnels associés pourrait permettre d'identifier rigoureusement l'ensemble des facteurs structuraux participant à cette étape essentielle du mécanisme. Ces hypothèses pourraient ensuite être testées expérimentalement par ingénierie protéique et en appliquant la méthode développée dans ce travail. L'exemple préliminaire décrit pour la RALDH2 L459R montre que l'impact de modifications du site actif sur la vitesse du processus d'isomérisation peut être déduite de l'analyse des cinétiques réactionnelles enregistrées en mode de détection du signal de FRET.

Est-il possible de généraliser cette approche à l'étude de l'isomérisation du cofacteur au cours de la catalyse pour d'autres ALDH ? Nous avons tenté dans un premier temps d'appliquer la même stratégie à la RALDH1 (également nommée ALDH1 cytosolique ou ALDH1A1 dans la nomenclature proposée par V. Vasiliou), dans laquelle les résidus Trp, en particulier en position 177, sont conservés par rapport à la RALDH2. Cependant, aucun signal correspondant à une phase décroissante pouvant être attribuée à un changement conformationnel du NADH n'a pu être observé dans les cinétiques de la RALDH1 avec le décanal en conditions préstationnaires.

En parallèle, cette approche a été étendue à la GAPN de *S. mutans*, avec au préalable la nécessité d'introduire une sonde spectroscopique équivalente au W177 de la RALDH2. En effet

Discussion-Perspectives

aucun signal cinétique pouvant correspondre à l'isomérisation de la partie NMNH n'était observé dans la GAPN. La superposition des structures cristallines de ces deux enzymes a permis de proposer trois positions situées dans l'environnement de la position 177, où l'introduction d'un tryptophane était susceptible de générer un signal de FRET avec le NADH : S177, I128 et D462 (figure 42).

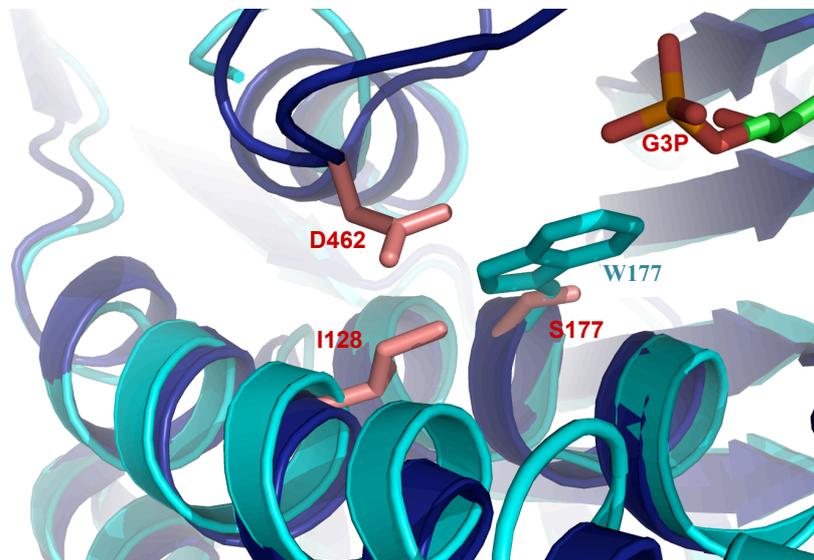


Figure 42 : Superposition des structures de la RALDH2 (en bleu turquoise, complexe binaire avec le NAD, code PDB 1bi9) et du complexe thioacylenzyme de la GAPN de *S. mutans* (en bleu marine, code PDB 2QE0) dans la région du résidu 177.

Les résidus Ser177, Asp462 et Ile128 où l'introduction d'un résidu tryptophane était susceptible de générer un signal de FRET avec le NADPH dans la GAPN sont en rose, et le résidu Trp177 de la RALDH2 est en bleu turquoise.

Les variants I128W, S177W et D462W ont donc été générés et étudiés : les deux premiers se sont révélés inactifs, le mutant D462W conservant une faible activité avec une constante k_{cat} diminuée d'un facteur 700. Ces effets drastiques sont probablement associés à une perturbation de l'architecture du site actif, en particulier au niveau de la position K178, impliquée dans le positionnement du NAD au cours de l'étape d'acylation (voir le § 2.3.2.1. p. 29). L'étape limitante de la réaction restant néanmoins associée à la désacylation pour la GAPN D462W, l'étude a été poursuivie à l'état préstationnaire. Toutefois aucune phase exponentielle décroissante précédant la phase linéaire n'a été détectée, ni en fluorescence directe du NADH, ni en conditions de détection du signal de FRET. L'introduction d'un tryptophane en cette position ne permet donc pas de visualiser un signal correspondant à l'isomérisation du NMNH dans la GAPN.

Les exemples de la RALDH1 et de la GAPN montrent que la présence du résidu Trp177 n'est pas une condition suffisante pour générer un signal spectroscopique spécifique permettant de suivre l'isomérisation du cofacteur. En effet, pour pouvoir être visualisée et donc formalisée selon un modèle cinétique, les valeurs relatives des amplitudes de l'étape d'acylation (positive) et de l'isomérisation (négative), ainsi que les constantes de vitesse associées aux différentes étapes

doivent être compatibles (figure 35 page 85) : par exemple, si l'isomérisation s'avère rapide par rapport à l'acylation, les signaux correspondant aux deux phases peuvent être confondus ; dans le cas où l'amplitude de l'isomérisation est relativement faible et que la désacylation qui suit est rapide, le signal d'isomérisation peut être « écrasé ». L'exemple de la RALDH2 s'avère donc être un cas favorable dans lequel les conditions structurales et cinétiques se trouvent réunies et permettent l'observation de ce signal.

Dans le cas des ALDH CoA-dépendantes comme la MSDH, cette isomérisation n'est à priori pas indispensable, le mécanisme montrant la dissociation complète du cofacteur réduit après le transfert d'hydrure. Cependant, l'examen de la structure cristalline de la MSDH de *B. subtilis*, décrite dans la partie 3 des résultats, a révélé l'existence d'une cavité similaire à celle décrite dans la GAPN, ce qui rend possible une étape d'isomérisation préalable à la dissociation du cofacteur réduit (figure S3 page 105). Mais cette isomérisation est-elle réellement impliquée dans le cycle catalytique de la MSDH ? La superposition de structures non publiées, celle de l'intermédiaire thioacylenzyme et celle d'un complexe ternaire MSDH/NAD/CoA suggère que la présence de la partie NMNH empêcherait l'attaque nucléophile du CoA sur l'intermédiaire thioacylenzyme décarboxylé à cause d'une gêne stérique (figure 43). Il est donc raisonnable de penser que le cofacteur réduit bascule également dans cette poche soit avant sa dissociation, soit de façon concomitante.

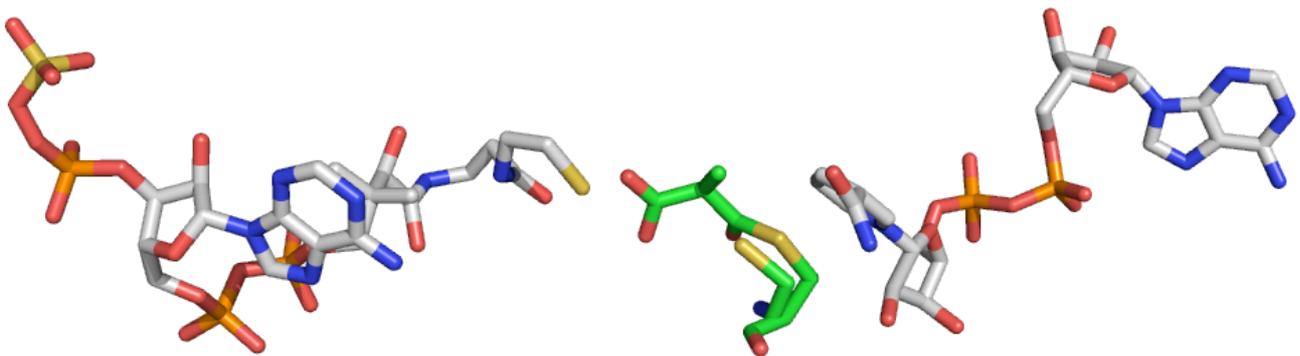


Figure 43 : Superposition des structures cristallines de l'intermédiaire thioacylenzyme et du complexe ternaire MSDH/NAD/CoA. Dans la structure de l'intermédiaire thioacylenzyme, le cofacteur NADH est absent des cartes de densité, donc déjà dissocié, et le thioacylenzyme n'est pas encore décarboxylé. Ces résultats sont en accord avec le mécanisme de type ping-pong proposé à partir des données cinétiques. Dans la structure du complexe MSDH/NAD/CoA, le bras pantéthéine du CoA adopte une conformation étendue. Pour que l'attaque nucléophile du CoA puisse avoir lieu, il est donc probable que la partie NMNH pivote pour permettre une rotation de l'intermédiaire thioacylenzyme décarboxylé.

Discussion-Perspectives

Nous avons tenté de conforter cette hypothèse par la méthode utilisant le signal de FRET, le résidu Trp177 étant conservé dans la MSDH. Les cinétiques obtenues en fluorescence directe du NADH et en conditions de détection du signal FRET avec le substrat naturel MMSA n'ont pas révélé de signal pouvant correspondre au basculement du cofacteur réduit dans ces conditions. Des essais ont également été tentés avec le PPA, un analogue du substrat naturel décarboxylé, et en présence de CoA, qui est nécessaire pour une acylation efficace avec ce substrat (Talfournier *et al.*, 2011). Les résultats obtenus en conditions de détection du signal de FRET ont révélé un profil cinétique comprenant une phase exponentielle croissante et une phase linéaire, entre lesquelles est visible une phase exponentielle décroissante, qui correspondrait soit à l'isomérisation du NMNH, soit à la dissociation du cofacteur réduit. Cependant la nécessité de la présence du CoA implique un mécanisme cinétique différent d'un mécanisme de type ping-pong décrit pour la MSDH avec le substrat naturel.

En conclusion, le fait que l'isomérisation du cofacteur se produise vraisemblablement dans la MSDH mais ne puisse pas être visualisée avec le substrat naturel montre que l'utilisation de méthodes de modélisation et de dynamique moléculaire apparaît indispensable pour établir un scénario global incluant l'isomérisation du cofacteur, sa dissociation et les changements conformationnels affectant l'enzyme.

Si elle s'avère concluante, cette démarche permettra également de visualiser les événements associés à la dynamique du cofacteur réduit au niveau de la poche de liaison de l'adénine. En effet, comme nous l'avons montré dans les résultats partie 3, la faible stabilisation du cycle adénine est un élément clé à l'origine de la dissociation précoce du NADH au cours du cycle catalytique de la MSDH. Cette étude identifie pour la première fois les bases moléculaires par lesquelles le mode de liaison du cofacteur est responsable au moins en partie, des mécanismes cinétiques distincts caractérisés chez les ALDH hydrolytiques et CoA-dépendantes. A partir de structures très similaires, l'évolution aurait donc conduit à des différences subtiles dans le mode de reconnaissance du cofacteur. Plus précisément, la stabilisation globale du cofacteur résulte des contributions relatives des deux sous-sites de liaison : dans les ALDH hydrolytiques, celle-ci est principalement assurée par des interactions avec la partie adénine, alors que dans les ALDH CoA-dépendantes ce sont les interactions avec la partie nicotinamide qui prévalent.

Une faible stabilisation globale est essentielle pour favoriser la dynamique du cofacteur au cours de la catalyse. Cependant, il est indispensable que dans les deux cas le cycle nicotinamide soit correctement positionné au sein du complexe covalent thiohémiacétal/NAD pour permettre un transfert d'hydrure efficace au cours de l'acylation, d'où l'importance d'un compromis entre stabilisation et flexibilité. Cette notion est illustrée par l'ampleur des effets cinétiques observés pour

les mutants V229G/H226P, V229G::

Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Vecteurs plasmidiques

pDB125KS N/N : Plasmide recombinant pBluescript II KS portant le gène de résistance à l'ampicilline et la séquence codant la GAPN de *S. mutans* sous le contrôle du promoteur du gène *lac Z*.

pSKmsdbsub : Plasmide recombinant pBluescript II KS portant le gène de résistance à l'ampicilline et la séquence codant la MSDH de *B. subtilis* sous le contrôle du promoteur du gène *lac Z*.

pET / RALDH2 : Plasmide recombinant pET 14b modifié portant le gène de résistance à l'ampicilline et la séquence codant la RALDH2 de rat fusionnée à une étiquette His Tag du côté N-terminal, sous le contrôle du promoteur du phage T7.

pET / RALDH1 : Plasmide recombinant pET 20b portant le gène de résistance à l'ampicilline et la séquence codant la RALDH1 humaine sous le contrôle du promoteur du phage T7.

1.2. Souches bactériennes

***E. coli* DH5 α** : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan, 1983). Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique pour la GAPN, la MSDH et les RALDH1 et 2 mutées ou sauvages, mais également l'expression et la production en erlenmeyers des enzymes GAPN et MSDH sauvages ou mutées.

***E. coli* C41 (DE3)** : Cette souche est dérivée de la souche BL21 (DE3) : F⁻ *dcm ompT hsdS_B* (*r_B*- *m_B*-) *gal* λ (DE3) et deux mutations non caractérisées (Miroux et Walker, 1996). Elle est utilisée pour l'expression et la production des RALDH1 et 2 sauvages ou mutées à partir de vecteurs de la série pET. Cette souche contient une copie chromosomique de la séquence codant l'ARN polymérase du bactériophage T7 placée sous le contrôle du promoteur *lacUV5* inductible par l'IPTG.

1.3. Milieux de culture

- Milieu riche LB (Luria Bertani)

Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L). le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/L de milieu de culture avant stérilisation. Les milieux sont autoclavés pendant 20 min à 120 °C et à 1 bar. Afin de sélectionner les clones recombinants, l'antibiotique approprié est ajouté après stérilisation. Ce milieu est utilisé pour la réalisation des minipréparations d'ADN plasmidique ainsi que pour la production des enzymes GAPN et MSDH.

- Milieu SOC

Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM). Ce milieu est utilisé pour la régénération des bactéries compétentes après transformation.

- Milieux auto-inductibles ZYM 5052 et N5052

ZYM 5052 : tryptone (10 g/L), extrait de levure (5 g/L), Na₂HPO₄ (25 mM), KH₂PO₄ (25 mM), NH₄Cl (50 mM), Na₂SO₄ (5 mM), glycérol (0,5%), glucose (0,05%), lactose (0,2%), MgSO₄ (1 mM), FeCl₃ (5 µM), CaCl₂ (2 µM), MnCl₂ (1 µM), ZnSO₄ (1 µM), CoCl₂ (0,2 µM), CuCl₂ (0,2 µM), NiCl₂ (0,2 µM), Na₂SeO₃ (0,2 µM), Na₂MoO₄ (0,2 µM) et H₃BO₃ (0,2 µM). Le pH est ajusté à 7,4. Ce milieu est utilisé pour la production de la RALDH2 de rat et de la RALDH1 humaine. L'auto-induction repose sur les mécanismes mis en œuvre par la bactérie pour réguler l'utilisation des sources d'énergie carbonées présentes dans le milieu de culture. En présence de glucose, la répression catabolique empêche l'entrée du lactose dans la cellule par la lactose perméase. Quand le glucose est consommé en totalité, le lactose peut être pris en charge pour être converti en allolactose par la β-galactosidase, l'inducteur naturel du promoteur *lac* dont dépend l'expression de l'ARN polymérase T7 et donc de la RALDH2 (Studier, 2005).

N5052 : Na₂HPO₄ (50 mM), KH₂PO₄ (50 mM), Na₂SO₄ (5 mM), glycérol (0,5%), glucose (0,05%), lactose (0,2%), MgSO₄ (1 mM), FeCl₃ (5 µM), CaCl₂ (2 µM), MnCl₂ (1 µM), ZnSO₄ (1 µM), CoCl₂ (0,2 µM), CuCl₂ (0,2 µM), NiCl₂ (0,2 µM), Na₂SeO₃ (0,2 µM), Na₂MoO₄ (0,2 µM) et H₃BO₃ (0,2 µM), NH₄Cl (50 mM). Le pH est ajusté à 7,4. Ce milieu est utilisé pour la production de la RALDH1 humaine.

2. Techniques de génie génétique

2.1. Préparation et transformation des cellules compétentes

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5 α et C41 (DE3). Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 35 et 37 °C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 30 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10^{ème} du volume initial de solution TB, en présence de diméthyle sulfoxyde (7% final) et incubé 2 heures dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C (Inoue *et al.*, 1990).

La méthode classique de transformation des bactéries compétentes est utilisée (Sambrook *et al.*, 1989). La transformation est réalisée en mélangeant 1 à 100 ng de plasmide et 50 μ L de bactéries compétentes. Après incubation dans de la glace pendant 30 min, le mélange est soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42 °C. Les cellules sont ensuite régénérées 1 heure à 37 °C en milieu SOC avant d'être étalées sur boîte LB avec l'antibiotique de sélection adapté. Les boîtes sont enfin placées à 37 °C pendant une nuit.

2.2. Préparation de l'ADN plasmidique

La minipréparation d'ADN est utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN dans un but analytique, à partir de 5 mL de culture. Les cellules sont lysées grâce à une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1 %. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 90 %. Le culot ainsi obtenu est ensuite lavé à l'éthanol à 70 % puis séché, repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. L'ADN plasmidique est finalement traité par la ribonucléase A (1 μ g/mL). Un kit de purification plasmidique (Macherey-Nagel®) est utilisé pour les préparations en plus grande quantité. Ce kit utilise la méthode de la lyse alcaline et permet de purifier le plasmide d'intérêt à l'aide d'une résine échangeuse d'anions.

2.3. Mutagenèse dirigée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette méthode nécessite un plasmide double brin superenroulé et deux oligodésoxyribonucléotides complémentaires portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides vont servir d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase thermostable *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), conduisant à un plasmide muté aux extrémités non reliées. La méthode utilise la *Pfu* pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité. Etant donnée la faible vitesse d'élongation de la *Pfu* liée à son activité 3'-exonucléase, il faut adapter la durée d'élongation en fonction de la taille du plasmide (2 min/kb).

Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité par l'endonucléase *DpnI* (Biolabs, séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, afin de digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé à partir de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *DpnI*. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et coupé, est utilisé pour transformer des bactéries DH5 α supercompétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et le répliquer. La présence de la mutation est testée par séquençage sur des minipréparations d'ADN issues de clones de transformation.

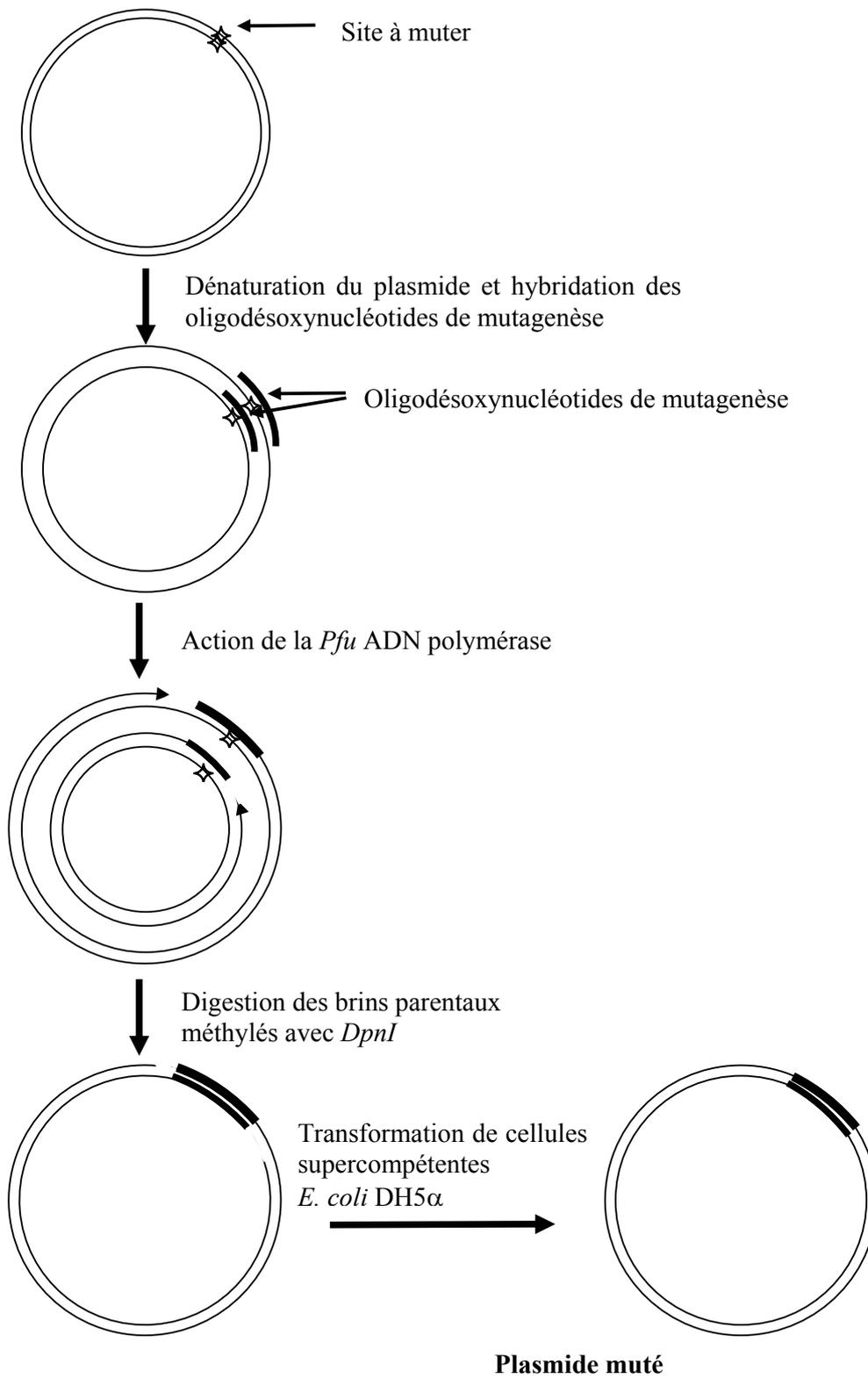


Figure 44 : Principe de la mutagenèse dirigée selon la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.4. Clonage de la RALDH1 humaine

La technique de PCR permet de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADN génomique ou plasmidique (dans ce cas) compris entre deux oligodésoxyribonucléotides, dont les séquences sont complémentaires aux bordures du fragment d'ADN à amplifier et permet de créer les sites de restriction *Nde* I et *Eco* RI. L'ADN polymérase utilisée pour la réaction est la *Pfu*. La présence et la taille de l'ADN amplifié sont vérifiées par dépôt sur gel d'agarose 1%. Cet ADN est ensuite extrait du gel grâce au kit NucleoSpin (Macherey-Nagel®). Cette extraction est basée sur l'utilisation de colonnes échangeuses d'anions, l'ADN étant chargé négativement. Les vecteurs d'expression et les inserts sont ensuite digérés pendant 1h30 à 37 °C par les enzymes de restriction *Nde* I et *Eco* RI à raison de 3 unités par µg d'ADN. La formation des liaisons phosphodiester entre les extrémités de l'insert et du vecteur d'expression est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4. La ligation se fait en présence d'un excès d'insert de 3 fois par rapport au vecteur linéarisé. Les mélanges de ligation sont incubés à 16 °C pendant au moins 4h. La présence de l'insert est vérifiée par une double digestion du vecteur par les enzymes de restriction *Nde* I et *Eco* RI, ou par PCR sur colonies en utilisant cette fois-ci la polymérase Dynazyme.

3. Production et purification des enzymes étudiées

3.1. Production

Les enzymes étudiées, de type sauvage et mutées, sont produites dans la souche *d'E. coli* DH5α pour les GAPN et les MSDH et la souche C41(DE3) pour les RALDH1 et 2. Ces souches sont transformées par le plasmide recombinant exprimant les enzymes correspondantes. Les cultures des GAPN et MSDH sontensemencées au 1/100^{ème} en milieu LB supplémenté en ampicilline (200 mg/L), et ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C, sous agitation. Pour les RALDH1 et 2, les cultures sontensemencées au 1/100^{ème} en milieu auto-inductible ZYM5052 ou N5052, supplémenté en ampicilline (200 mg/L), puis incubées pendant 16 heures à 37 °C, sous agitation. Les cellules récoltées par centrifugation à 4000 g sont lavées dans du tampon A (Saccharose 25 %, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) puis centrifugées et stockées à -20 °C.

3.2. Purification

3.2.1. La GAPN de *S. mutans*

3.2.1.1. Sonication et précipitation au sulfate d'ammonium

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 mL de tampon de purification (KPi 50 mM, pH 6.4, β -mercaptoéthanol 5 mM) puis soniqué à 0 °C sous une puissance de 40 W pendant 5 min, par périodes de 1 seconde d'ultrasons et 1 seconde d'arrêt. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 17000 g durant 45 min.

Le surnageant de sonication est amené à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium (SA) et précipité 45 min sous légère agitation à 4 °C. A cette concentration en SA, la majorité des protéines contaminantes se retrouve dans le culot après centrifugation pendant 30 min à 17000 g.

3.2.1.2. Chromatographie d'interactions hydrophobes

Le surnageant de précipitation est dilué dans du tampon KPi 50 mM pH 6.4 à une concentration finale en SA de 1 M, puis est injecté sur une colonne de type Phényl Sepharose HP (volume de 55 mL, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans du tampon KPi 50 mM pH 6.4, 1 M SA. Les protéines sont éluées par un gradient décroissant de SA de 1 à 0 M. L'éluion est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. La GAPN est éluée à une concentration de 300 mM en SA et les fractions contenant la protéine sont rassemblées.

Cette étape permet de séparer la GAPN des contaminants protéiques en fonction de leurs propriétés hydrophobes de surface et d'éliminer la majorité des fragments d'acides nucléiques.

3.2.1.3. Chromatographie échangeuse d'anions

La solution protéique contenant la GAPN issue de l'étape précédente est alors diluée dans du tampon KPi 50 mM pH 6.4 afin de diminuer la force ionique puis elle est injectée sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose (résine d'agarose 6 % sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium) préalablement équilibrée avec du tampon KPi 50 mM pH 6.4 et couplée au système FPLC. L'éluion est réalisée par un gradient croissant de KCl de 0 à 1 M et elle est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. La GAPN est éluée à une concentration de 350 mM en KCl. Cette étape permet d'éliminer les derniers contaminants protéiques et les fragments d'acides nucléiques encore présents.

Matériels et Méthodes

Les fragments contenant la GAPN purifiée sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM30 (limite d'exclusion de 30 kDa). La protéine est précipitée à 90 % en SA puis elle est conservée à -20 °C en présence de 5 mM de β -mercaptoéthanol.

3.2.2. La MSDH de *B. subtilis*

3.2.2.1. Sonication et précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 mL de tampon de purification (KPi 50 mM, pH 8.2, β -mercaptoéthanol 10 mM) puis soniqué selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.1.1. Le surnageant de sonication est amené à 40 % de saturation en SA et placé une heure à 4 °C sous agitation douce. La protéine, restée en solution, est récupérée dans le surnageant après centrifugation pendant 45 min à 17000 g. Le surnageant est ensuite amené à 80 % de saturation en SA et placé à 4 °C pendant une heure. A cette concentration en SA, l'enzyme précipite et une dernière centrifugation permet de la récupérer dans le culot.

3.2.2.2. Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification KPi 50 mM pH 8.2 puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA 34 (résine d'acrylamide 3 %, agarose 4 %, BIOSEPRA) dont le domaine de fractionnement se situe entre 20 et 350 kDa. L'élution s'effectue dans le même tampon et les fractions contenant la protéine sont identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide à 10 %. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées.

3.2.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions

Le même protocole est utilisé que dans le paragraphe 3.2.1.3., la colonne étant équilibrée avec du tampon KPi 50 mM pH 8.2. La MSDH est éluée à une concentration de 330 mM en KCl.

Les fractions contenant la MSDH purifiée sont rassemblées, concentrées et précipitées selon le même protocole que dans le paragraphe 3.2.1.4.

3.2.3. La RALDH1 humaine

3.2.3.1. Sonication et précipitation au sulfate d'ammonium

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 mL de tampon de purification (KPi 50 mM, pH 7.5, DTT 2 mM) puis soniqué selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.1.1. Le surnageant de sonication est amené à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium (SA) et précipité 45 min sous légère agitation à 4 °C. A cette concentration en SA, l'enzyme précipite et une dernière centrifugation permet de la récupérer dans le culot.

3.2.3.2. Filtration sur gel, chromatographie échangeuse d'anions et chromatographie d'interactions hydrophobes

Les protocoles sont les mêmes que dans les paragraphes 3.2.2.2., 3.2.1.3. et 3.2.1.2. respectivement pour la filtration sur gel, la chromatographie échangeuse d'anions et la chromatographie d'interactions hydrophobes, utilisées dans l'ordre.

En effet le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification KPi 50 mM pH 7.5 puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA 34. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et injectées sur une colonne Q-Sepharose HP, préalablement équilibrée avec du tampon KPi 50 mM pH 7.5. La RALDH1 est éluée à une concentration de 220 mM en KCl. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et amenée à une concentration de 1 M de SA et injectées sur une colonne Phényl-Sepharose équilibrée avec du tampon KPi 50 mM pH 7.5, 1 M de SA. La RALDH1 est éluée à une concentration de 50 mM de SA. Les fractions contenant la protéine purifiée sont rassemblées, concentrées et précipitées selon le même protocole que dans le paragraphe 3.2.1.4.

3.2.4. La RALDH2 de rat

3.2.4.1. Sonication et dialyse du surnageant de sonication

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 mL de tampon de conservation (KPi 20 mM, pH 7.5, KCl 200 mM, DTT 2 mM) puis soniqué selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.1.1.

Le surnageant de sonication est ensuite dialysé à 4 °C pendant 4 h contre 2 L de tampon de conservation puis dialysé une deuxième fois sur la nuit contre 2 L de tampon de purification. Ces étapes permettent d'éliminer des petites molécules substrats non spécifiques de la RALDH2 qui copurifient avec la protéine.

3.2.4.2. Chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺ (IMAC)

La protéine est retenue sur la résine grâce à des interactions spécifiques entre les ions Ni²⁺ fixés préalablement à la résine et la séquence His-Tag fusionnée du côté N-terminal. Ces interactions sont dues aux propriétés du noyau imidazole des histidines, qui possèdent un doublet d'électrons libres (à pH 7.5) porté par un atome d'azote, pouvant former des complexes avec les ions métalliques divalents comme le Cu²⁺ ou le Ni²⁺. Les ions Ni²⁺ sont fixés à la résine qui possède des groupements iminodiacétiques, chélateurs de ces ions.

Le surnageant de sonication filtré est injecté sur la colonne Ni-Sepharose HP (25 mL, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC, préalablement équilibrée avec du tampon de purification et en présence de 50 mM d'imidazole. La présence d'imidazole lors de la charge a pour but d'éviter la fixation non spécifique de protéines contaminantes, tout assurant la fixation de la totalité de la RALDH2. A plus forte concentration, l'imidazole contenu dans le tampon d'élution entre en compétition avec les chaînes latérales des histidines de l'étiquette His-Tag de la protéine. L'élution est obtenue par un palier à une concentration de 500 mM d'imidazole et est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions contenant la RALDH2 purifiée sont rassemblées et dialysées contre du tampon de conservation en présence de 15 % de glycérol. La protéine est ensuite conservée à -20 °C en présence de 20 mM de DTT.

4. Caractérisation biochimique des protéines

4.1. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification. Après concentration des protéines par migration dans un gel 5 % en polyacrylamide, celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 10 % en polyacrylamide. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250 (Studier, 2005).

4.2. Détermination des coefficients d'extinction molaire ϵ des protéines

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été déterminé à l'aide des méthodes de Lewis (Mach *et al.*, 1992) et de Gill et von Hippel (Gill et von Hippel, 1989). La méthode de Lewis repose sur le calcul de la concentration en protéine par une relation empirique :

$$DO_{280} - 10^{(2,5 * \text{Log} DO_{320} - 1,5 * \text{Log} DO_{350})}$$

$$C = \frac{\text{5540} * \text{nombre de Tryptophanes par monomère} + \text{1480} * \text{nombre de Tyrosines par monomère}}{\text{5540} * \text{nombre de Tryptophanes par monomère} + \text{1480} * \text{nombre de Tyrosines par monomère}}$$

La méthode de Gill et von Hippel est fondée sur la mesure des densités optiques à 280 nm pour la protéine en conditions native et dénaturante (en présence de chlorure de guanidinium). Le calcul de la concentration en conditions dénaturantes repose sur la valeur théorique du coefficient d'extinction molaire à 280 nm ($\epsilon_{\text{dénat}} = 1280 * \text{nombre Tyrosines} + 5560 * \text{nombre Tryptophanes}$).

4.3. Fluorescence et anisotropie de fluorescence

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été réalisés sur un fluorimètre Flx (SAFAS) équipé de deux monochromateurs. Les constantes de dissociation de la RALDH1 pour le rétinol ont été déterminées par titration en suivant l'anisotropie de fluorescence du rétinol (10 μM) dans le tampon Hépès 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MPD 20 %, pH 8,5 à 25 °C, avec des concentrations croissantes en RALDH1, mesurée à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 325 et 482 nm et de fentes de 10 nm. L'appareil détermine l'anisotropie des échantillons excités par une source polarisée verticalement selon la relation :

$$A = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}}$$

avec : I_{VV} : intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation verticale pour l'excitation et l'émission ; et I_{VH} : intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation horizontale pour l'émission.

Matériels et Méthodes

Le facteur G de l'appareil représente le ratio de la sensibilité du détecteur pour la lumière polarisée verticalement et horizontalement et est calculé à chaque mesure. La fraction de complexe enzyme / rétinol formé est déterminée par la relation $(A - A_0) / (A_{\max} - A_0)$, où A_0 et A_{\max} représentent l'anisotropie du rétinol sous forme libre et liée, en fonction de la concentration en RALDH1. Les données ont été ajustées à un modèle simple à un site de liaison par monomère.

5. Caractérisation enzymatique des protéines

5.1. Tests enzymatiques

Les tests d'activité réalisés sur la GAPN de *S. mutans* et la MSDH de *B. subtilis* sont effectués respectivement dans le tampon TES 50 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, pH 8.2 à 25 °C et dans le tampon KPi 50 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, pH 8.2 à 30 °C après activation de la MSDH par une préincubation avec 2 mM de NAD pendant 20 min à 30 °C (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Concernant les RALDH1 et 2, les tests réalisés sont effectués dans le tampon Hépès 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8.5 à 25 °C, et en présence ou non de Tween 80 0,05 % ou de 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD).

La réaction est déclenchée par l'ajout de la solution d'enzyme dans une cuve contenant le cofacteur NAD(P) et le substrat spécifique de l'enzyme. Les réactions enzymatiques sont suivies spectrophotométriquement par l'apparition du NAD(P)H à 340 nm au cours du temps, sur un appareil UV mc2 (SAFAS) pour les substrats autres que le rétinol. Dans le cas du rétinol, la réaction catalysée par la RALDH1 est suivie par l'évolution de la DO à 340 nm correspondant à la contribution de l'apparition de NADH et d'acide rétinoïque et de la disparition du rétinol, dont la résultante produit un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de $31000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans ces conditions. En raison d'une faible valeur du K_M , la réaction d'oxydation du rétinol catalysée par la RALDH2 a été suivie par la fluorescence du NADH, plus sensible que l'absorbance, permettant de mesurer la réaction à de très faibles concentrations en rétinol.

5.2. Détermination des paramètres cinétiques K_M et k_{cat} à l'état stationnaire

Les mesures d'activité ont été réalisées en faisant varier la concentration d'un réactif (substrats ou cofacteurs), les autres étant en concentration saturante. Les points expérimentaux ont été ajustés soit à l'équation de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le substrat (D,L)-G3P (équation 2) pour la GAPN, soit à l'équation classique

de Michaelis-Menten (équation 1) à l'aide du logiciel SigmaPlot 2000 6.0 (Jandel Scientific) pour toutes les autres conditions et enzymes.

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

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

5.3. Cinétiques à l'état préstationnaire

5.3.1. Suivi de l'étape d'acylation

Les cinétiques à l'état préstationnaire ont été suivies à l'aide d'un appareil de cinétique à mélange rapide (stopped flow SX18MV-R, Applied Photophysics), qui permet de mélanger rapidement deux solutions contenues initialement dans des seringues, et de suivre la variation de l'absorbance à 340 nm dans le cas de la MSDH ou l'émission de fluorescence du mélange dans le cas des RALDH1 et 2, le temps mort de l'appareil étant de l'ordre de la milliseconde.

Pour les études menées sur la MSDH, la première seringue contient l'enzyme (30 µN) et le NAD (4 mM) dans du tampon KPi 50 mM pH 8.2 et la deuxième contient le substrat MMSA (2 mM) dans le même tampon KPi. La température est maintenue à 30 °C. Les cinétiques sont suivies par variation de l'absorbance à 340 nm. Pour les études sur les RALDH1 et 2, la première seringue contient l'enzyme (2 µN), le NAD (2 mM) dans du tampon d'activité, et la deuxième seringue contient le NAD (2 mM) et le substrat dans le même tampon. La température est maintenue à 25 °C, les fentes sont réglées à 1 mm au niveau du monochromateur d'excitation. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 350 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 395 nm.

5.3.2. Détermination de la constante de vitesse de dissociation du NADH

Les conditions expérimentales utilisées pour la détermination du k_{off} du NADH, un piège à NADH utilisant le système couplé Lactate Déshydrogénase (LDH) / pyruvate, sont décrites dans le chapitre « Experimental procedures » de la publication 2 page 102. La première seringue contient l'enzyme (32 µN) et le NAD (4 mM) dans du tampon KPi 50 mM

Matériels et Méthodes

pH 8.2 et la deuxième contient le substrat MMSA (2 mM) et le système couplé Lactate Déshydrogénase (LDH) / pyruvate à des concentrations de 32 μ N et 20 mM respectivement, dans le même tampon KPi. Les cinétiques sont suivies *via* la variation de l'absorbance à 340 nm. La température est maintenue à 30 °C.

5.3.3. Suivi du phénomène d'isomérisation du cofacteur

Les cinétiques ont été réalisées à l'aide d'un appareil de cinétique à mélange rapide (stopped flow SX18MV-R, Applied Photophysics). La longueur d'onde est fixée à 350 ou 295 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 395 nm. Les fentes sont réglées à 1 mm au niveau du monochromateur d'excitation. La première seringue contient l'enzyme (RALDH1 ou 2) (2 μ N), le NAD (2 mM) dans du tampon d'activité, et la deuxième seringue contient le NAD (2 mM) et le substrat décanal dans le même tampon. La température est maintenue à 25 °C.

5.3.4. Cinétiques d'interactions RALDH / rétinol

Pour étudier les interactions entre le rétinol et les RALDH1 et 2, la longueur d'onde est fixée à 295 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 455 nm. La première seringue contient l'enzyme (2 μ N) et la deuxième contient le rétinol (30 μ M), en présence ou en absence de NAD (2 mM). Les cinétiques sont ajustées à une équation de type biexponentielle.

*Références
bibliographiques*

ALTUCCI, L., GRONEMEYER, H. (2001).

The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 181-93.

ARMSTRONG, J. M., TRENTHAM, D. R. (1976).

The reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate with thiols and the holoenzyme of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and of inorganic phosphate with the acyl-holoenzyme. *Biochem. J.*, **159(3)**, 513-27.

BEKRI, S., FOSSOUD, C., PLAZA, G., GUENNE, A., SALOMONS, G. S., JAKOBS, C., VAN OBBERGHEN, E. (2004).

The molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in one family. *Mol. Genet. Metab.*, **81(4)**, 347-51.

BORDELON, T., MONTEGUDO, S. K., PAKHOMOVA, S., OLDHAM, M. L., NEWCOMER, M. E. (2003).

A disorder to order transition accompanies catalysis in retinaldehyde dehydrogenase type II. *J. Biol. Chem.*, **279(41)**, 43085–91.

BOSTIAN, K. A., BETTS, G. F. (1978).

Kinetics and Reaction of Potassium-Activated Aldehyde Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **173**, 787–98.

BRADBURY, S. L., JAKOBY, W. B. (1971).

Ordered Binding of Substrates to Yeast Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1834–40.

BURCHAM, P. C., RASO, A., THOMPSON, C. A. (2010).

Toxicity of smoke extracts towards A549 lung cells: role of acrolein and suppression by carbonyl scavengers. *Chem. Biol. Interact.*, **183(3)**, 416-24.

CHAMBLISS, K. L., GRAY, R. G., RYLANCE, G., POLLITT, R. J., GIBSON, K. M. (2000).

Molecular characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **23(5)**, 497-504.

CHERN, M.K., PIETRUSZKO, R. (1995).

Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213(2)**, 561-8.

COBESSI, D., TETE-FAVIER, F., MARCHAL, S., AZZA, S., BRANLANT, G., AUBRY, A. (1999).

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

COBESSI, D., TETE-FAVIER, F., MARCHAL, S., BRANLANT, G., AUBRY, A. (2000).

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

COOPER, K. L. (1986).

Making the diabetes connection. *Am. J. Nurs.*, **86(9)**, 1009-10.

Références bibliographiques

CRAIG, S. A. (2004).

Betaine in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80(3)**, 539-49.

CRAVO, M. L., CAMILO, M. E. (2000).

Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status. *Nutrition*, **16(4)**, 296-302.

D'AMBROSIO, K., PAILOT, A., TALFOURNIER, F., DIDIERJEAN, C., BENEDETTI, E., AUBRY, A., BRANLANT, G., CORBIER, C. (2006).

The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis. *Biochemistry*, **45(9)**, 2978-86.

DEL RIO, D., STEWART, A. J., PELLEGRINI, N. (2005).

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

DEMOZAY, D., ROCCHI, S., MAS, J.-C., GRILLO, S., PIROLA, L., CHAVEY, C., VAN OBERGHEN, E. (2004).

Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J. Biol. Chem.*, **279(8)**, 6261-70.

DIDIERJEAN, L., CARRAUX, P., GRAND, D., SASS, J. O., NAU, H., SAURAT, J. H. (1996).

Topical retinaldehyde increases skin content of retinoic acid and exerts biologic activity in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.*, **107**, 714-9.

DOBBS-MCAULIFFE, B., ZHAO, Q., LINNEY, E. (2004).

Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.*, **121(4)**, 339-50.

DUESTER, G. (2000).

Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.*, **267(14)**, 4315-24.

DUESTER, G., MIC, F. A., MOLOTKOV, A. (2003).

Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 201-10.

DUPE, V., MATT, N., GARNIER, J.-M., CHAMBON, P., MARK, M., GHYSELINCK, N. B. (2003).

A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100(24)**, 14036-41.

ECKFELDT, J. H., YONETANI, T. (1976).

Kinetics and mechanism of the F1 isozyme of horse liver aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **173(1)**, 273-81.

FAIT, A., YELLIN, A., FROMM, H. (2005).

GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants. *FEBS letters*, **579(2)**, 415-20.

FARHANA, L., DAWSON, M. I., XIA, Z., ABOUKAMEEL, A., XU, L., LIU, G., DAS, J. K., HATFIELD, J., LEVI, E., MOHAMMAD, R., FONTANA, J. A. (2010).

Adamantyl-substituted retinoid-related molecules induce apoptosis in human acute myelogenous leukemia cells., *Mol. Cancer. Ther.*, **9(11)**, 2903-13.

FARRES, J., GUAN, K. L., WEINER, H. (1989).

Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences. *Eur. J.Biochem.*, **180(1)**, 67-74.

FARRES, J., WANG, T. T., CUNNINGHAM, S. J., WEINER, H. (1995).

Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **34(8)**, 2592-8.

FENTON, W. A., ROSENBERG, L. E. (1995).

Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *Metab. Mol. Bas. Inher. Dis.*, 1423-49.

FITZGERALD, T. L., WATERS, D. L. E., HENRY, R. J. (2008).

Betaine aldehyde dehydrogenase in plants, *Plant Biol.*, **11**, 119-30.

FLIEGE, R., FLÜGGE, U.I., WERDAN, K., HELDT, H.W. (1978).

Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **502(2)**, 232-47.

GHILARDUCCI, D. P., TJEERDEMA, R. S. (1995).

Fate and effects of acrolein. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **144**, 95-146.

GIBSON, K. M. (2005).

Gamma-hydroxybutyric aciduria: a biochemist's education from a heritable disorder of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **28(3)**, 247-65.

GIBSON, K. M., GUPTA, M., PEARL, P. L., TUCHMAN, M., VEZINA, L. G., III, O. C. S., SMIT, L. M. E., JAKOBS, C. (2003).

Significant Behavioral Disturbances in Succinic, *Biol. Psychiatry*, **54(7)**, 763-8.

GIBSON, K. M., LEE, C. F. I., BENNETT, M. J., HOLMES, B., NYHAN, W. L. (1993).

Combined malonic, methylmalonic and ethylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase deficiencies : an inborn error of beta-alanine, L-valine and L-alloisoleucine metabolism ?, *J. Inher. Metab.*, **16**, 563-7.

GILL, S. C., VON HIPPEL, P. H. (1989).

Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182(2)**, 319-26.

GINESTIER, C., HUR, M. H., CHARAFE-JAUFFRET, E., MONVILLE, F., DUTCHER, J., BROWN, M., JACQUEMIER, J., VIENS, P., KLEER, C., SCHOTT, A., HAYES, D., BIRNBAUM, D., WICHA, M. S., DONTU, G. (2007).

ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell. Stem. Cell.*, **1(5)**, 555-67.

Références bibliographiques

GRAY, R. G., POLLITT, R. J., WEBLEY, J. (1987).

Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: demonstration of defective valine and beta-alanine metabolism and reduced malonic semialdehyde dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **38(1)**, 121-4.

GREENBERG, M. E., LI, X.-M., GUGIU, B. G., GU, X., QIN, J., SALOMON, R. G., HAZEN, S. L. (2008).

The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **283(4)**, 2385-96.

GRONEMEYER, H., MITURSKI, R. (2001).

Molecular mechanisms of retinoid action. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **6**, 3-52.

GUDAS, L. J. (2012).

Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1821(1)**, 213–21.

GULEC, M., GUREL, A., ARMUTCU, F. (2006).

Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol. Cell. Biochem.*, **290(1-2)**, 61-7.

HABENICHT, A., HELLMAN, U., CERFF, R. (1994).

Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. Mol. Biol.*, **237(1)**, 165-71.

HANAHAHAN, D. (1983).

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166(4)**, 557-80.

HARPER, A. E., MILLER, R. H., BLOCK, K. P. (1984).

Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **4**, 409-54.

HEMPEL, J., LINDAHL, R. (1989).

Class III aldehyde dehydrogenase from rat liver: super-family relationship to classes I and II and functional interpretations. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **290**, 3-17.

HO, K. K., HURLEY, T. D., WEINER, H. (2006).

Selective alteration of the rate-limiting step in cytosolic aldehyde dehydrogenase through random mutagenesis. *Biochemistry*, **45**, 9445- 53.

HUANG, J., HIRJI, R., ADAM, L., ROZWADOWSKI, K. L., HAMMERLINDL, J. K., KELLER, W. A et SELVARAJ, G. (2000).

Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant physiology*, **122(3)**, 747-56.

HURLEY, T. D., PEREZ-MILLER, S., BREEN, H. (2001).

Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132(1-3)**, 3–14.

- IKUTA S, MATUURA K, IMAMURA S, MISAKI H, HORIUTI Y. (1977).
Oxidative pathway of choline to betaine in the soluble fraction prepared from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biochem.*, **82(1)**, 157-63.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990).
High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, **96**, 23-8.
- JOHANSSON, K., EL-AHMAD, M., RAMASWAMY, S., HJELMQVIST, L., JORNVALL, H., EKLUND, H. (1998).
Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.*, **7**, 2106-17.
- KELLY, G. J., GIBBS, M. (1973).
A mechanism for the indirect transfer of photosynthetically reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate from chloroplasts to the cytoplasm. *Plant physiology*, **52**, 674-76.
- KILBURN, K. H. (1994).
Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. *Arch. Environ. Health.*, **49(1)**, 37-44.
- KIM, H., LAPOINTE, J., KAYGUSUZ, G., ONG, D. E., LI, C., VAN DE RIJN, M., BROOKS, J. D., ET AL. (2005).
The retinoic acid synthesis gene *ALDH1a2* is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer res.*, **65(18)**, 8118-24.
- KUMAR, S., SANDELL, L. L., TRAINOR, P. A., KOENTGEN, F., DUESTER, G. (2012).
Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1821(1)**, 198–205.
- KUZMIC, P. (1996).
Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.*, **237(2)**, 260-73.
- LAEMMLI, U. K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-5.
- LAMB, A. L., NEWCOMER, M. E. (1999).
The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry*. **38(19)**, 6003-11.
- LARSON, R. S., TALLMAN, M. S. (2003).
Retinoic acid syndrome: manifestations, pathogenesis, and treatment. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, **16(3)**, 453-61.
- LARSON, H. N., WEINER, H., HURLEY, T. D. (2005).
Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant., *J. Biol. Chem.*, **280**, 30550-6

Références bibliographiques

LECLERC, J., DES ROSIERS, C., MONTGOMERY, J.A., BRUNET, J., STE-MARIE, L., REIDER, M.W., FERNANDEZ, C.A., POWERS, L., DAVID, F., BRUNENGRABER, H. (1995). Metabolism of R-beta-hydroxypentanoate and of beta-ketopentanoate in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, **268**, 446-52.

LEVER, M., SLOW, S. (2010).

The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin. Biochem.*, **43(9)**, 732-44.

LEVER, M., ATKINSON, W., GEORGE, P.M., CHAMBERS, S.T. (2007).

An abnormal urinary excretion of glycine betaine may persist for years. *Clin. Biochem.*, **40**, 798-801.

LIKES, R., MADL, RL, ZEISEL, SH, CRAIG, SA. (2007).

The betaine and choline content of a whole wheat flour compared to other mill streams., *J. Cereal. Sci.*, **46(1)**, 93-95.

LIN, J. T., WU, M. S., WANG, W. S., YEN, C. C., CHIOU, T. J., LIU, J. H., YANG, M. H., CHAO, T. C., CHOU, S. C., CHEN, P. M. (2003).

All-trans retinoid acid increases Notch1 transcript expression in acute promyelocytic leukemia. *Adv. Ther.*, **20(6)**, 337-43.

LIN, S.W., CHEN, J.C., HSU, L.C., HSIEH, C.L., YOSHIDA, A. (1996)

Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, **34(3)**, 376-80.

LINDAHL, R. (1992).

Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**: 283-335.

LIU, Z. J., SUN, Y. J., ROSE, J., CHUNG, Y. J., HSIAO, C. D., CHANG, W. R., KUO, I., PEROZICH, J., LINDAHL, R., HEMPEL, J., WANG, B. C. (1997).

The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold., *Nat. Struct. Biol.* **4(4)**, 317-26.

LIVINGSTONE, J. R., MARUO, T., YOSHIDA, I., TARUI, Y., HIROOKA, K., YAMAMOTO, Y., TSUTUI, N., HIRASAWA, E. (2003).

Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. plant res.*, **116(2)**, 133-40.

LORENTZEN, E., HENSEL, R., KNURA, T., AHMED, H., POHL, E. (2004).

Structural Basis of allosteric regulation and substrate specificity of the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. *J. Mol. Biol.*, **341(3)**, 815-28.

LUDEMAN, S. M. (1999).

The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Des.*, **5(8)**, 627-43.

- MA, T. H., HARRIS, M. M. (1988).
Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat. Res.*, **196(1)**, 37-59.
- MACGIBBON, A K., BLACKWELL, L. F., BUCKLEY, P. D. (1977).
Pre-steady-state kinetic studies on cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.*, **167(2)**, 469–77.
- MACH, H., MIDDAUGH, C. R., LEWIS, R. V. (1992).
Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal. Biochem.* **200(1)**, 74-80.
- MADEN, M. (2007).
Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 755-65.
- MALY, I. P., CROTET, V., TORANELLI, M. (2003).
The so-called "testis-specific aldehyde dehydrogenase" corresponds to type 2 retinaldehyde dehydrogenase in the mouse. *Histochem. Cell. Biol.*, **119(2)**, 169-74.
- MALPELI, G., STOPPINI, M., ZAPPONI, M. C., FOLLI, C., BERNI, R. (1995).
Interactions with retinol and retinoids of bovine cellular retinol-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **229**, 486-493.
- MANJASETTY, B. A., POWLOWSKI, J., VRIELINK, A. (2003).
Crystal structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100(12)**, 6992-7.
- MARCHAL, S., BRANLANT, G. (1999).
Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*, **38(39)**, 12950-8.
- MARCHAL, S., RAHUEL-CLERMONT, S., BRANLANT, G. (2000).
Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*, **39(12)**, 3327-35.
- MARCHAL, S., BRANLANT, G. (2002).
Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.*, **277(42)**, 39235–42.
- MARCHITTI, S. A., BROCKER, C., STAGOS, D., VASILIOU, V. (2008).
Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes : the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4(6)**, 697–720.
- MARCHITTI, S.A., CHEN, Y., THOMPSON, D.C., VASILIOU, V. (2011).
Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens.*, **37(4)**, 206-13.

Références bibliographiques

- MASSEY, L.K., SOKATCH, J.R., CONRAD, R.S. (1976).
Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40(1)**, 42-54.
- MEY, J. (2006).
New Therapeutic Target for CNS Injury ? The Role of Retinoic Acid Signaling after Nerve Lesions. *J. Neurobiol.*, **66**, 757-79.
- MICHELS, S., SCAGLIARIN, L. S., SETA, F. D., CARIES, C., RIVA, M., TROST, B. P., BRANLANT, G. (1994).
Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *FEBS letters*, **339**, 97-100.
- MIROUX, B., WALKER, J. E. (1996).
Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels., *J. Mol. Biol.*, **260(3)**, 289-98.
- MIYAUCHI, K., MASAKI, R., TAKETANI, S., YAMAMOTO, A, AKAYAMA, M., TASHIRO, Y. (1991).
Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA for rat liver microsomal aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **266(29)**, 19536-42.
- MOORE, S. A, BAKER, H. M., BLYTHE, T. J., KITSON, K. E., KITSON, T. M., BAKER, E. N. (1998).
Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*, **6(12)**, 1541-51.
- MUÑOZ-CLARES, R. A, DIAZ-SANCHEZ, A. G., GONZALEZ-SEGURA, L., et MONTIEL, C. (2010).
Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch. Biochem. Biophys.*, **493(1)**, 71-81.
- NAPOLI, J. L. (1986).
Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of retinoic acid synthesis by an established mammalian cell line., *J. Biol. Chem.*, *261(29)*, 13592-7.
- NAPOLI, J. L. (1999).
Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. et biophys. Acta.*, **1440 (2-3)**, 139-62.
- NAPOLI, J. L. (2012).
Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1821(1)**, 152-67.
- NI, L., SHEIKH, S., WEINER, H. (1997).
Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **272(30)**, 18823-6.

- NIEDERREITHER, K., VERMOT, J., SCHUHBAUR, B., CHAMBON, P., DOLLE, P. (2002). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*, **129(15)**, 3563-74.
- NIKI, E. (2011). Do free radicals play causal role in atherosclerosis ? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48(1)**, 3-7.
- NILES, R. M. (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat. Res.*, **555(1-2)**, 81-96.
- NOY, N. (2010). Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis, *Annu. Rev. Nutr.*, **30**, 201-17.
- PAILOT, A., D'AMBROSIO, K., CORBIER, C., TALFOURNIER, F., BRANLANT, G. (2006). Invariant Thr244 is essential for the efficient acylation step of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochem. J.*, **400(3)**, 521-30.
- PARES, X., FARRES, J., KEDISHVILI, N., DUESTER, G. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65(24)**, 3936-49.
- PARISOTTO, M., BRODEUR, H., BHAT, P.V., MADER, S. (2006). Métabolisme des rétinoïdes et cancer. *Med. Sci.*, **22(12)**, 1101-6.
- PAYNE, R.C., NICHOLS, B.P., HECHT, S.M. (1987). *Escherichia coli* tryptophan synthase: synthesis of catalytically competent alpha subunit in a cell-free system containing preacylated tRNAs. *Biochemistry*, **26(11)**, 3197-205.
- PEARL, P. L., SHUKLA, L., THEODORE, W. H., JAKOBS, C., GIBSON, K. M. (2011). Epilepsy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism. *Brain and Development*, **33(9)**, 796-805.
- PEREZ-MILLER, S. J., HURLEY, T. D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **42(23)**, 7100-9.
- PIETRUSZKO, R., KIKONYOGO, A., CHERN, M. K. ET IZAGUIRRE, G. (1997). Human aldehyde dehydrogenase E3. Further characterization. *Adv. Exp. Med. Bio.*, **414**, 243-52.
- POLI, G., SCHAUR, R. J., SIEMS, W. G., LEONARDUZZI, G. (2008). 4-Hydroxynonenal : A Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest. *Med. Res. Rev.*, **28(4)**, 569-631.
- POLLITT, R. J., GREEN, A., SMITH, R. (1985). Excessive Excretion of p-Alanine and of S-2- (Hydroxymethyl) butyric Acids Probably Due to a Defect in the Metabolism of the Corresponding Malonic Semialdehydes. *J. Inher. Metab.*, **8**, 75-79.

Références bibliographiques

- POWLOWSKI, J., SAHLMAN, L., SHINGLER, V. (1993).
Purification and properties of the physically associated meta-cleavage pathway enzymes 4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, **175**(2), 377-85.
- PUROHIT, V., GAO, B., SONG, B.-J. (2009).
Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **33**(2), 191–205.
- RAHUEL-CLERMONT, S., ARUTYUNOV, D., MARCHAL, S., ORLOV, V., MURONETZ, V., BRANLANT, G. (2005).
Thermal destabilization of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* upon phosphate binding in the active site. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18590-7.
- RHODES, D, HANSON, A. D. (1993).
Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 357–84.
- ROSSMANN, M. G., MORAS, D., OLSEN, K. W. (1974).
Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*. **250**(463), 194-9.
- SAARI, J. C., NAWROT, M., KENNEDY, B. N., GARWIN, G. G., HURLEY, J. B., HUANG, J., POSSIN, D. E., CRABB, J. W. (2001).
Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron*, **29**, 739-48.
- SAITO, Y., NISHIO, K., YOSHIDA, Y., NIKI, E. (2005).
Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology*, **210**(2-3), 235-45.
- SAKAMOTO, A, MURATA, N. (1999).
Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Experim. Bota.*, **51**(342), 81-8.
- SAMBROOK, J., GETHING, M. J. (1989).
Protein structure. Chaperones, paperones., *Nature*, **342**(6247), 224-5.
- SASS, J. O., WALTER, M., SHIELD, J. P., ATHERTON, A. M., GARG, U., SCOTT, D., WOODS, C. G., SMITH, L. D. (2012).
3-Hydroxyisobutyrate aciduria and mutations in the ALDH6A1 gene coding for methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **35**(3), 437-42.
- SCHNEIR, A.B., LY, B.T., CLARK, R.F. (2001).
A case of withdrawal from the GHB precursors gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. *J. Emerg. Med.*, **21**(1), 31-3.
- SETSHEDI, M., WANDS, J. R., DE LA MONTE, S. M. (2010).
Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **3**(3), 178-85.

- SHI, R., RICKETT, T., SUN, W. (2011).
Acrolein-mediated injury in nervous system trauma and diseases. *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 1320-31.
- SHONE, C. C., FROMM, H. J. (1981).
Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **20(26)**, 7494-501.
- SIEBERS, B., SCHÖNHEIT, P. (2005).
Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8(6)**, 695-705.
- SÖHLING, B., GOTTSCHALK, G. (1993).
Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.*, **212(1)**, 121-7.
- SOPRANO, D. R., TEETS, B. W., SOPRANO, K. J. (2007).
Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells, *Vitam. Horm.* **75**, 69-95.
- STEINMETZ, C. G., XIE, P., WEINER, H., HURLEY, T. D. (1997).
Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, **5(5)**, 701-11.
- STINES-CHAUMEIL, C., TALFOURNIER, F., BRANLANT, G. (2006).
Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, **395(1)**, 107-15.
- STUDIER, F. W. (2005).
Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, **41(1)**, 207-34.
- SZUTS, E. Z., HAROSI, F. I. (1991).
Solubility of retinoids in water, *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, 297-304.
- TALFOURNIER, F., STINES-CHAUMEIL, C., BRANLANT, G. (2011).
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: substrate specificity and coenzyme A binding. *J. Biol. Chem.*, **286(25)**, 21971-81.
- TENG, S., BEARD, K., POURAHMAD, J., MORIDANI, M., EASSON, E., POON, R., O'BRIEN, P. J. (2001).
The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132(1-3)**, 285-96.
- TRAN, C., KASRAEE, B., GRAND, D., CARRAUX, P., DIDIERJEAN, L., SORG, O., SAURAT, J. H. (2005).
Pharmacology of RALGA, a mixture of retinaldehyde and glycolic acid. *Dermatology.*, **210 Suppl 1**, 6-13.

Références bibliographiques

TROST, P., PUPILLO, P. (1993).

Inhibition of spinach D-glyceraldehyde 3-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase (nonphosphorylating) by adenylate compounds: the effect of dead-end inhibitors on a steady state random reaction mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306(1)**, 76-82.

VALLARI, R. C., PIETRUSZKO, R. (1981).

Kinetic mechanism of the human cytoplasmic aldehyde dehydrogenase E1. *Arch. Biochem. Biophys.*, **212(1)**, 9-19.

VALVERDE, F., LOSADA, M., SERRANO, A. (1999).

Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant GapN gene. *FEBS letters*, **449(2-3)**, 153-8.

VAZ, F.M., VAN GOOL, S., OFMAN, R., IJLST, L., WANDERS, R.J. (1999).

Carnitine biosynthesis. Purification of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **466**, 117-24.

VEDADI, M., SZITTNER, R., SMILLIE, L., MEIGHEN, E. (1995).

Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP(+)-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry*, **34(51)**, 16725-32.

VERNET, N., DENNEFELD, C., ROCHETTE-EGLY, C., OULAD-ABDELGHANI, M., CHAMBON, P., GHYSELINCK, N. B., MARK, M. (2006).

Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology*, **147(1)**, 96-110.

WAAGEPETERSEN, H. S., SONNEWALD, U., SCHOUSBOE, A. (1999).

The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.*, **73(4)**, 1335-42.

WANG, X., WEINER, H. (1995).

Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **34(1)**, 237-43.

WANG, C., KANE, M. A., NAPOLI, J. L. (2011).

Multiple retinol and retinal dehydrogenases catalyze all-trans-retinoic acid biosynthesis in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **286**, 6542-53.

WANG, X., PENZES, P., NAPOLI, J. L. (1996).

Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate, *J. Biol. Chem.*, **271**, 16288-93.

YIN, H., XU, L., PORTER, N. A. (2011).

Free Radical Lipid Peroxidation : Mechanisms and Analysis, *Chem. Rev.*, **111(10)**, 5944-72.

YU, H. S., OYAMA, T., ISSE, T., KITAGAWA, K., PHAM, T. T., TANAKA, M., KAWAMOTO, T. (2010).

Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. *Chem. Biol. Interact.*, **188(3)**, 367-75.

ZHANG, Y., REN, J. (2011).

ALDH2 in alcoholic heart diseases: molecular mechanism and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics*, **132(1)**, 86–95.

ZHOU, J., WEINER, H. (2000).

Basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **39**, 12019-24.

ZIOUZENKOVA, O., ORASANU, G., SHARLACH, M., AKIYAMA, T. E., JOEL, P., VIERECK, J., HAMILTON, J. A., TANG, G., DOLNIKOWSKI, G. G., VOGEL, S., DUESTER, G., PLUTZKY, J. (2007).

Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity, *Nat. Med.*, **13(6)**, 695–702.

Résumé

Les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P)⁺ non phosphorylantes hydrolytiques ou Coenzyme A(CoA)-dépendantes (ALDH) sont des enzymes ubiquitaires qui catalysent l'oxydation d'un spectre très étendu d'aldéhydes en acides activés ou non. Elles jouent un rôle essentiel au niveau cellulaire en intervenant notamment à différents niveaux du métabolisme cellulaire et dans des processus de détoxication. Les ALDH opèrent par un mécanisme à deux étapes : une étape d'acylation incluant un processus d'oxydoréduction à transfert d'hydrure qui conduit à la formation d'un intermédiaire thioacylenzyme suivie d'une étape de désacylation qui diffère par la nature de l'accepteur d'acyle, une molécule d'eau ou de CoA. Une caractéristique essentielle du mécanisme catalytique de ces enzymes est l'importance de la flexibilité et de la dynamique conformationnelle dans le site actif, incluant les chaînes latérales de résidus, le substrat, et le cofacteur.

Dans la rétinol déshydrogénase 2 (RALDH2), une des ALDH impliquées dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque, les données disponibles au début du projet suggéraient que la réaction d'oxydation du rétinol était associée à des changements conformationnels au sein du site actif. Dans ce contexte, un de mes objectifs a consisté à identifier les bases moléculaires de la reconnaissance du rétinol dans les RALDH1 et 2 en développant une méthodologie spécifique associant l'analyse du mécanisme enzymatique et l'étude de la formation du complexe michaélien. L'exploitation des propriétés de transfert résonnant d'énergie de fluorescence entre l'analogue de substrat rétinol et la protéine montre que la reconnaissance du substrat rétinol suit un mécanisme à deux étapes : une étape de liaison et une étape de réorganisation structurale cinétiquement limitante. Ce processus contribuerait à la spécificité de ces enzymes pour le rétinol.

Le second axe de mon projet a été consacré à l'étude de la dynamique du cofacteur réduit au cours de la catalyse :

En vue de caractériser le processus d'isomérisation du cofacteur réduit au cours de la catalyse, j'ai développé une méthode permettant de suivre ce basculement en utilisant un signal de FRET entre le cofacteur réduit et la protéine. Cette méthode a permis d'établir un modèle cinétique pour déterminer la constante de vitesse intrinsèque associée à cette étape.

Enfin, j'ai cherché à identifier les bases moléculaires responsables de la dissociation tardive du cofacteur au cours du cycle catalytique des ALDH hydrolytiques ou précoce dans le cas des ALDH CoA-dépendantes. Cette étude s'inscrivait dans une thématique plus générale visant à comprendre l'évolution des mécanismes catalytiques dans la superfamille des ALDH. Les résultats obtenus montrent que la faible stabilisation du cycle adénine est à l'origine de la dissociation précoce du NADH au cours du cycle catalytique de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase, une ALDH CoA-dépendante. Cette étude révèle pour la première fois le mécanisme par lequel le mode de liaison du cofacteur conduit à des différences de mécanisme cinétique entre les ALDH hydrolytiques et CoA-dépendantes.

Mots clés : Aldéhyde déshydrogénase, rétinol, NAD(P)H, Coenzyme A, dynamique conformationnelle, catalyse, évolution