



HAL
open science

Les thioltransférases, des agents doubles impliqués dans le métabolisme du sulfure d'hydrogène : de la catalyse aux rôles physiologiques

Jean-Christophe Lec

► To cite this version:

Jean-Christophe Lec. Les thioltransférases, des agents doubles impliqués dans le métabolisme du sulfure d'hydrogène : de la catalyse aux rôles physiologiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0305 . tel-01934624

HAL Id: tel-01934624

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01934624v1>

Submitted on 18 Nov 2020

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



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 Jean-Christophe LEC

*Les thioltransférases, des agents doubles impliqués dans le
métabolisme du sulfure d'hydrogène : de la catalyse aux rôles
physiologiques*

17 novembre 2017

Membres du jury

Rapporteurs

Mme Hélène MUNIER-LEHMANN
Mr Charles TELLIER

Chargé de Recherche, INSERM, Institut Pasteur, Paris
Professeur, Université de Nantes, Nantes

Examineurs

Mme Catherine CORBIER
Mr Fernando RODRIGUES-LIMA
Mme Sandrine BOSCHI-MULLER

Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Professeur, Université Paris Diderot, Paris
Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse

Mr François TALFOURNIER

Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy
Co-directeur de thèse

UMR 7365 – CNRS-UL, Laboratoire IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaires)

Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine, Bâtiment Biopôle, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre Les Nancy – France

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (UMR 7365 CNRS-UL).

Je remercie mes encadrants de thèse, Sandrine et François, pour la confiance qu'ils m'ont accordé en m'acceptant en thèse et durant ces trois années de thèse ainsi que pour leur bonne humeur quotidienne.

Je remercie Madame Hélène Munier-Lehmann de l'Institut Pasteur et Monsieur Charles Tellier de l'Université de Nantes pour avoir accepté de juger ces travaux en qualité de rapporteurs. Je remercie également Monsieur Fernando Rodrigues-Lima pour avoir accepté d'être présent à ma soutenance de thèse en qualité d'examineur. Je remercie particulièrement Madame Catherine Corbier pour avoir jugé ma thèse en tant qu'examinatrice mais aussi pour m'avoir accueilli à l'IUT Nancy-Brabois où j'ai eu le plaisir d'enseigner pendant trois ans.

Je remercie toutes les personnes avec lesquelles j'ai collaboré durant ma thèse. Je remercie Frédérique Favier, Guillermo Mulliert et Claude Didierjean pour leur sympathie et leur professionnalisme lors de nos échanges concernant les aspects de biologie structurale. Je remercie Pascal Reboul, Meriem Koufany, Hélène Schneider, Frédéric Cailotto et Jean-Yves Jouzeau pour leurs précieux conseils et leur réactivité dans le cadre de la collaboration en biologie cellulaire. Je remercie Oscar N. Ventura pour nos échanges dans le cadre de la collaboration de chimie théorique. Enfin je remercie toutes les personnes de la SATT Grand-Est avec qui j'ai travaillé et particulièrement Aude Hyardin qui suit notre projet depuis le début.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire IMoPA pour leur sympathie, leurs conseils et les agréables moments passés pendant ces trois années. Plus particulièrement je voudrais remercier les membres de l'équipe 3 avec lesquels j'ai travaillé, à commencer par Séverine (Sèv) et Sabrina (Sab) qui m'ont formé quand je suis arrivé en master 1, merci à vous deux pour vos conseils, votre sympathie et votre disponibilité. Je tiens à remercier Alexandre (Alex) pour le travail que nous avons effectué ensemble et également toutes les discussions que nous avons entretenues. Je remercie également Hortense pour son aide en spectrométrie de masse et Hélène pour son aide sur la fin de mon projet de thèse. Je remercie également l'ensemble des autres permanents de l'équipe 3, Christophe, Benjamin, Arnaud, Sophie et Kira pour leur sympathie et toutes les discussions scientifiques (ou autres) que nous avons eu ensemble.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer au laboratoire, Florent, Elodie, Viola et Roméo, merci à vous 4 pour le travail effectué et votre sympathie.

Je remercie particulièrement mes amis doctorants qui m'ont accueilli au laboratoire à commencer par Thibault (le Vosgien), Jonathan (Johnny), Benoit (Beubs), Arnaud (ARNo), Yoann (Baloo) et Toinou (el presidente), merci à vous pour votre accueil chaleureux et ces super moments passés avec vous. Je remercie les post-doctorants de l'équipe à commencer par Omar ainsi que Dorothea (Dodo). Je remercie tout particulièrement les plus jeunes doctorants que j'ai eu l'immense plaisir d'accueillir au « bureau-doc » à commencer par Fanny (Fafa ainsi que Mathias), Florent (Flo) et Jean-Malo (JMM). Merci à vous tous pour ces super moments (intra et extra laboratoire) passés et également pour les futurs à venir.

Je remercie également mes amis de Besançon, à commencer par la petite troupe et notre amitié qui dure depuis 15 ans, Eric, Gaëtan (Gueguette), Camille (Cam) et Quentin, un grand merci à vous 4 pour tous ces instants dépaysants passés ensemble et pour tous les autres à venir. Je remercie également mes amis de la faculté à commencer par les bisontins Jean (JDD) pour notre binôme de choc, Nicolas (Nico) et Danny ainsi que les lorrains Vincent (Vince), Raphaël (Raph, mon binôme de M2) et Paul.

Merci à Christine, Patrick, Louise et Constance pour votre soutien et tous les moments agréables passés avec vous.

Je remercie mes deux frères, Paul (Edouardo) et P.H. (dit Tout-Gros), mes confidents, pour avoir toujours été à mes côtés depuis le tout début. Votre soutien, vos encouragements et votre simple présence à mes côtés m'ont porté jusque-là.

Un grand merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes choix. Merci pour votre soutien sans failles et votre bienveillance. C'est avec un immense plaisir que je vous dédie ce travail.

Merci à Justine (Juju) qui partage ma vie. Merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années. Merci pour ton amour et tous ces bons conseils. C'est avec sérénité et un immense bonheur que je pense à l'avenir qu'il nous reste à construire et c'est avec joie que je te dédie ce travail.

Table des matières

Préambule ----- 1

◆ Synthèse bibliographique ◆

Chapitre I. Le sulfure d'hydrogène ----- 3

I. Généralités----- 3

1) Historique----- 3

2) Propriétés physicochimiques----- 4

3) Les différents dérivés pouvant conduire à la libération d'H₂S ----- 6

4) Réactivité d'H₂S et de ses différents dérivés ----- 7

a) Rôle dans la sulfuration ----- 7

b) Rôle d'antioxydant----- 8

5) Mécanismes de formation des espèces polysulfures dans la cellule----- 9

II. Métabolisme d'H₂S chez les mammifères ----- 11

1) Concentration intracellulaire en H₂S libre ----- 11

2) Anabolisme d'H₂S ----- 12

3) Catabolisme d'H₂S ----- 14

a) Complexe d'oxydation du sulfure (SOU) ----- 15

b) Elimination du sulfure d'hydrogène par l'hémoglobine et la myoglobine ----- 15

III. Rôles physiologiques proposés d'H₂S chez les mammifères ----- 16

1) Modulation de la bioénergétique mitochondriale ----- 17

2) Rôle de cytoprotection ----- 18

3) Rôle antioxydant par activation du facteur de transcription Nrf2 ----- 19

4) Rôle anti apoptotique par activation du facteur de transcription NFκB ----- 20

5) Rôle vasodilatateur et pro angiogénique ----- 21

6) Rôle dans l'apprentissage et la mémorisation ----- 23

7) Rôle de protection des photorécepteurs ----- 24

8) Rôle de protection de l'articulation ----- 25

9) Thérapeutiques à base de donneurs lents d'H₂S et d'inhibiteurs de synthèse----- 26

Chapitre II. Les thioltransférases à domaine rhodanèse ----- 29

I. La superfamille des protéines à domaine rhodanèse ----- 29

II. Structure tridimensionnelle des 3-MST et TST ----- 31

1) Structure des 3-MST ----- 31

2) Structure des TST----- 33

III. Mécanisme et spécificités de substrats des 3-MST et TST ----- 35

1) Mécanisme et spécificités de substrats des 3-MST ----- 35

Table des matières

a) Mécanisme cinétique -----	35
b) Spécificités de substrats donneurs et accepteurs de soufre-----	37
c) Catalyse de transfert de soufre -----	38
2) Mécanisme et spécificités de substrats des TST-----	39
a) Mécanisme cinétique -----	39
b) Spécificités de substrats donneurs et accepteurs de soufre-----	41
c) Catalyse de transfert de soufre -----	42
IV. Rôles physiologiques des thioltransférases -----	42
1) Gènes chez l'Homme -----	42
2) Rôle commun de détoxication du cyanure -----	43
3) Rôles proposés pour les 3-MST -----	45
4) Rôles proposés pour les TST-----	48
Chapitre III. Le complexe SOU-----	52
I. Les deux hypothèses de fonctionnement du complexe SOU -----	52
1) Hypothèse du Dr. Jorns -----	52
2) Hypothèse du Dr. Banerjee-----	53
3) Preuves expérimentales en faveur de l'implication des enzymes du complexe SOU -----	53
II. La sulfure dioxygénase humaine ETHE1 -----	54
1) Structure tridimensionnelle d'ETHE1 -----	54
2) Mécanisme et spécificités de substrats d'ETHE1 -----	56
a) Mécanisme catalytique -----	56
b) Spécificités de substrats -----	57
3) Rôles physiologiques d'ETHE1 -----	57
Objectifs de la thèse -----	61
◆ Résultats ◆	
Chapitre I. Travaux préliminaires -----	63
I. Production et purification des thioltransférases humaines -----	63
1) La 3-MST -----	63
2) La TSTD1-----	64
3) La Rhodanèse -----	64
II. Mise au point des méthodes d'étude des réactions de transfert de soufre -----	66
1) Cinétiques des réactions à l'état stationnaire -----	67

2) Cinétiques de la première étape de transfert de soufre -----	68
3) Cinétiques de la deuxième étape de transfert de soufre -----	71

Chapitre II. Catalyse de formation de l'intermédiaire persulfure -----75

I. Mécanisme catalytique des 3-MST -----	75
II. Mécanisme catalytique de la TSTD1 -----	113
1) En présence de TS -----	113
2) En présence de 3-MP -----	114
3) Apports de la structure 3D -----	116
4) Rôle des résidus Glu31 et Arg84 -----	118
5) Rôle du résidu Gln80 -----	119
6) Scenarii de la première étape (TS vs. 3-MP) -----	120

Chapitre III. Etude de la spécificité de substrats des thioltransférases à domaine rhodanèse ----- 122

I. Spécificités de substrats donneurs de soufre -----	122
1) Les 3-MST -----	122
2) Les TST -----	123
II. Spécificités de substrats accepteurs de soufre -----	125
1) Les 3-MST -----	125
2) Les TST -----	127
III. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire -----	128
1) Les 3-MST -----	129
2) Les TST -----	130

Chapitre IV. Etude préliminaire du complexe SOU ----- 132

1) Production/purification d'ETHE1 sous forme active -----	132
2) Etude des interactions entre ETHE1 et les thioltransférases humaines -----	134
a) Quenching de fluorescence -----	134
b) Anisotropie de fluorescence -----	136

◆ Discussion & Perspectives ◆

I. Mécanisme catalytique des thioltransférases à domaine rhodanèse -----	139
II. Quels rôles physiologiques pour les thioltransférases humaines ? -----	147
1) La ^h 3-MST : Un système cytosolique d'élimination du sulfite -----	147

Table des matières

2) Les thioltransférases dans le métabolisme d'H ₂ S -----	148
a) Anabolisme et signalisation : de nouveaux rôles pour les TST ? -----	148
b) Catabolisme : deux voies possibles ? -----	148
c) Thioltransférases et arthrose -----	151

◆ Matériels & Méthodes ◆

I. Matériels biologiques, milieux de cultures et tampons -----	155
1) Milieux et solutions tampons -----	155
2) Souches bactériennes -----	156
3) Plasmides -----	156
II. Techniques de génie génétique -----	157
1) Clonage / sous-clonage -----	157
2) Mutagénèse dirigée -----	159
3) Transformation des bactéries compétentes -----	160
III. Obtention des protéines recombinantes -----	161
1) Production et purification des protéines recombinantes ^{Ec} 3-MST et ETHE1 ----	161
a) Production et extraction des protéines recombinantes ^{Ec} 3-MST et ETHE1 ---	161
b) Chromatographie par interactions hydrophobes -----	162
c) Chromatographie échangeuse d'anions -----	162
2) Production et purification des protéines recombinantes ^{h3} 3-MST, TSTD1 et GlpE--	162
a) Production et extraction des protéines recombinantes ^{h3} 3-MST, TSTD1 et GlpE--	163
b) Chromatographie d'affinité sur complexe Ni ²⁺ -----	163
c) Chromatographie échangeuse d'anions -----	164
3) Production et purification de la protéine recombinante Rhodanèse humaine ----	164
a) Production et extraction de la protéine recombinante Rhodanèse humaine ---	164
b) Chromatographie d'affinité sur complexe Ni ²⁺ -----	164
c) Chromatographie échangeuse de cations -----	165
4) Degré de pureté, stockage et préparation des protéines recombinantes avant utilisation -----	165
a) Gels bilan de purification des protéines -----	165
b) Stockage -----	165
c) Préparation des protéines recombinantes avant utilisation -----	166
IV. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes -----	166
1) Dosage des groupements thiols libres par le 5,5-dithiobis(2-nitro)benzoate ----	166
2) Evaluation de la polydispersité des solutions protéiques -----	167

3) Evaluation du contenu en structures secondaires des protéines recombinantes -	167
4) Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes par spectrométrie de masse -----	168
5) Synthèse du glutathion persulfure (GSSH) et de la cystéine persulfure (CysSSH) -- -----	168
V. Caractérisation des propriétés enzymatiques des protéines recombinantes d'intérêts -----	169
1) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire -----	169
a) Utilisation du système couplé Trx réductase/NADPH pour les 3-MST et la GlpE -----	169
b) Utilisation d'une électrode H ₂ S pour les thioltransférases -----	171
c) Suivi de la formation potentielle d'H ₂ S ₂ par les thioltransférases par spectrophotométrie -----	172
d) Utilisation d'un kit de dosage enzymatique du sulfite pour étudier la réaction de transformation du sulfite en thiosulfate par la ^{h3} -MST et la Rhodanèse -----	173
e) Utilisation de l'électrode pO ₂ pour suivre l'activité d'ETHE1 -----	174
2) Mesure du pKa de la cystéine catalytique dans l'enzyme libre par spectrophotométrie -----	175
3) Etudes à l'état pré-stationnaire de la première étape de transfert de soufre des thioltransférases-----	175
a) Spectres de fluorescence des thioltransférases-----	175
b) Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre du substrat donneur vers la thioltransférase par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque-----	176
c) Etude de la première étape en fonction du pH-----	177
d) Quantification du pyruvate formé par la ^{Ec3} -MST en utilisant un Quenched-flow couplé à une chromatographie en phase inverse C18 -----	177
e) Mesure des effets isotopiques de solvant lors de la première étape -----	179
4) Mesure de la constante de vitesse de libération du pyruvate <i>k</i> _{off} -----	179
5) Déterminations des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire de la deuxième étape de transfert de soufre des thioltransférases -----	180
a) Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre de la ^{h3} -MST vers la Trx ---- -----	180
b) Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre de l'intermédiaire persulfure de la thioltransférase vers le substrat accepteur -----	181
VI. Techniques d'étude des complexes protéiques -----	182
1) Quenching de fluorescence-----	182
2) Anisotropie de fluorescence-----	183
Références bibliographiques -----	187

Abréviations

2-PDS	2,2'-dipyridyl disulfide
2-TP	2-mercaptopyridine
3-MP	3-mercaptopyruvate
3-MST	3-mercaptopyruvate sulfurtransférase
AF	Sonde Alexa Fluor® 488 5-SDP ester
AINS	Antiinflammatoire non stéroïdien
APOE	Apolipoprotéine E
ARE	« Antioxidant-response element »
bZIP	« Leucine zipper »
CAT	Cystéine aminotransférase
CBS	Cystathionine- β -synthase
<i>CBS</i>	Gène codant la CBS humaine
CHES	Acide N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonique
CL	Cystathionine lyase
COX2	Cyclo-oxygénase de type 2
CSE	Cystathionine- γ -lyase
<i>CTH</i>	Gène codant la CSE humaine
CysSSH	Cystéine persulfure
DAO	D-aminoacide oxydase
DHLA	Acide dihydrolipoïque
DLS	« Dynamic light scattering »
DMTS	Dimethyl trisulfure
DTNB	5,5-dithiobis (2-nitro) benzoate
DTT	Dithiothréitol
^{Ec} 3-MST	3-mercaptopyruvate sulfurtransférase d' <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
EE	Encéphalopathie éthylmalonique
eNOS	NO-synthase endothéliale
ERK	« Extracellular signal-regulated kinase »
ESI-MS	« Electrospray ionisation mass spectrometry »
ETHE1	« Ethylmalonic Encephalopathy 1 »
<i>ETHE1</i>	Gène codant la sulfure dioxygénase humaine
GlpE	TST bactérienne (Glycerol-3-phosphate <i>E. coli</i>)
GSH	Glutathion réduit

Abréviations

GSSG	Glutathion oxydé
GSSH	Glutathion persulfure
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
H ₂ S ₂	Disulfure de dihydrogène
H ₂ S _n	Polysulfure hydrogéné
^h 3-MST	3-mercaptopyruvate sulfurtransférase humaine
I _F	Intensité de fluorescence
I _{Fmax}	Variation maximale d'intensité de fluorescence
IKK	« IκB kinase »
iNOS	NO-synthase inductible
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
IκB	« Inhibitor of kappaB »
<i>K</i>	Constante d'affinité apparente
<i>KAT</i>	Gène codant la TSTD1 humaine
<i>k_{cat}</i>	Constante de vitesse catalytique
<i>k_{cat}/K_M</i>	Efficacité catalytique à l'état stationnaire
<i>K_D</i>	Constante de dissociation
Keap1	« Kelch-like ECH-associated protein 1 »
Keap1 ^{CRL}	« Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ubiquitin ligase »
<i>k_{lim}</i>	Constante de vitesse maximale à pH optimal
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis
<i>k_{max1}</i>	Constante de vitesse maximale de la première étape de transfert de soufre
<i>k_{max1}/K</i>	Efficacité catalytique de la première étape
<i>k_{max2}</i>	Constante de vitesse maximale de la deuxième étape
<i>k_{max2}/K</i>	Efficacité catalytique de la deuxième étape
<i>k_{obs}</i>	Constante de vitesse observée
<i>k_{off}</i>	Constante de vitesse apparente de dissociation
LB	Luria Bertani
LBNB	Luria bertani, NaCl, betaine
LDH	Lactate déshydrogénase
LMW	« Low molecular weight »
LTP	Potentialisation à long terme
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MBL	Metallo β-lactamase

MCDU	3-mercaptolactate cystéine disulfurée
MMP-13	« Matrix metallopeptidase 13 »
<i>MPST</i>	Gène codant la 3-MST humaine
MTS	« Mitochondrial targeting sequence »
NFκB	« Nuclear factor-kappa B »
Ni-Sep	Eluât de la colonne Ni-Sépharose
NLS	« Nuclear localisation sequence »
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
Nrf2	« NF-E2 p45-related factor 2 »
NTR	NADPH thiorédoxine réductase
ori	Origine de réplication du plasmide
PAGE	« Polyacrylamide gel electrophoresis »
PCA	Acide perchlorique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDE5A	Phosphodiesterase 5A
PGE2	Prostaglandine E2
pK_{app}	pK_a apparent
PKG	Protéine kinase G
PLP	Cofacteur pyridoxal phosphate
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPS3	« Ribosomal protein S3 »
RS _n H	Polysulfure organique
RSSH	Espèce persulfure
S ⁰	Soufre élémentaire
SDO	Sulfure dioxygénase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SKIE	« Solvant kinetic isotope effect »
SO	Sulfite oxydase
SOU	« Sulfide oxidation unit »
SQOR	Sulfide quinone oxidoreductase
TFA	Acide trifluoroacétique
TNB ⁻	Thionitrobenzoate
TNFα	« Tumor necrosis factor alpha »
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane

Abréviations

TRPA1	« Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 »
Trx	Thiorédoxine
TS	Thiosulfate
<i>TST</i>	Gène codant la Rhodanèse humaine
TST	Thiosulfate sulfurtransférase
TSTD1	Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain protein 1
VEGF	« Vascular endothelial growth factor »
α CG	Alpha cétooglutarate

Préambule

Le groupe redox de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale, spécialisé dans l'étude des enzymes à thiol, s'intéresse depuis 2012 aux thioltransférases à domaine rhodanèse, enzymes impliquées dans le métabolisme du sulfure d'hydrogène (H₂S). La signalisation cellulaire H₂S-dépendante intervient dans de nombreux processus physiologiques, dont certains pathophysiologiques sont associés au vieillissement, alors que les mécanismes moléculaires impliqués sont encore largement méconnus. Le présent projet est centré sur le métabolisme d'H₂S *via* la caractérisation *in vitro* du mécanisme moléculaire et des spécificités de substrat de différentes thioltransférases par des études de relations structure-fonction.

Dans le manuscrit, après une partie Synthèse bibliographique, les Résultats sont présentés en quatre chapitres, le second étant rédigé en partie sous forme de publication. La partie Discussion & Perspectives, qui présente une discussion plus approfondie des différents résultats, est suivie de la partie Matériels & Méthodes qui détaille les aspects expérimentaux.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I. Le sulfure d'hydrogène

I. Généralités

1) Historique

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est un gaz existant depuis plusieurs milliards d'années sur la planète et ayant accompagné l'évolution de la vie depuis son origine. Sur la terre, le volcanisme est la source majoritaire de l' H_2S atmosphérique. Dans le passé, ce gaz était présent en grande quantité dans l'air du fait de la présence d'un environnement anoxique. Ce gaz devint minoritaire de par la formation de l'oxygène moléculaire (O_2) par les cyanobactéries (Olson *et al.*, 2012). Les organismes ont évolué en s'adaptant aux changements d'atmosphère allant de l'utilisation de l' H_2S , puis du monoxyde d'azote (NO) et enfin de l' O_2 . Les eaux profondes renferment encore actuellement des zones extrêmes où les producteurs primaires ne sont pas des organismes photosynthétiques mais des bactéries chemoautotrophiques qui utilisent l' H_2S comme source d'énergie. L'évolution des espèces en fonction de l'atmosphère a donné naissance à une zonation écologique sur terre (Figure 1) (Yamasaki, 2005).

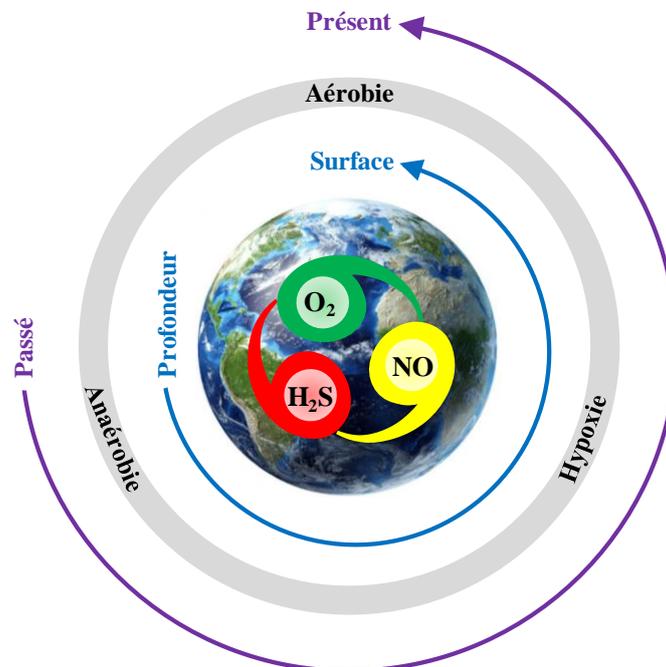


Figure 1. Diagramme conceptuel de la biologie ONS (adapté de Yamasaki et Cohen, 2016).

Les espèces les plus ancestrales retrouvées en profondeur dans des environnements anoxiques utilisent le sulfure d'hydrogène comme source d'énergie. L'évolution a conduit à l'apparition d'espèces vivant dans des conditions d'hypoxie qui utilisent le monoxyde d'azote puis sont apparues les espèces capables de vivre à la surface dans un environnement riche en oxygène.

Synthèse bibliographique

De nos jours, la plupart des espèces se sont adaptées à des milieux riches en oxygène. Le sulfure d'hydrogène a ainsi longtemps été considéré comme un polluant environnemental connu pour sa dangerosité avec une toxicité équivalente à cinq fois celle du monoxyde de carbone (Brito *et al.*, 2009).

Des voies de biosynthèse d'H₂S sont connues depuis plusieurs décennies chez les mammifères, la production de ce gaz dans la cellule ayant dans un premier temps été considérée comme une voie d'élimination des acides aminés soufrés ne présentant aucune fonction biologique (Goodwin *et al.*, 1989).

En 1996, l'équipe du Dr. Hideo Kimura proposa un rôle du sulfure d'hydrogène comme neuromodulateur endogène (Abe et Kimura, 1996). Cette publication a conduit à la création d'un nouveau champ de recherche dans lequel d'autres rôles d'H₂S dans la cellule ont émergé au cours de ces vingt dernières années. En 2002, le Dr. Rui Wang proposa que l'H₂S soit le troisième gazotransmetteur de l'organisme au même titre que le CO et le NO (Wang, 2002). En effet le sulfure d'hydrogène possède l'ensemble des caractéristiques d'un gazotransmetteur qui sont :

- être un gaz, capable de diffusion libre à travers les membranes, c'est-à-dire sans intervention de transporteurs,
- être synthétisé de manière endogène par voie enzymatique et cette production doit être régulée,
- avoir des fonctions précises aux concentrations physiologiques.

A ce jour, seuls le NO, le CO et l'H₂S répondent à ces critères, mais d'autres molécules pourraient rejoindre cette famille moléculaire à l'instar de l'ammoniaque ou du dioxyde de soufre (Huang *et al.*, 2015).

2) Propriétés physicochimiques

Le sulfure d'hydrogène est un gaz incolore inflammable présentant une forte odeur d'œuf pourri. Le chimiste Carl Wilhelm Scheele fut le premier à le synthétiser en 1777 en mélangeant du soufre métallique en milieu acide, puis cette réaction fut caractérisée par Claude Louis Berthollet en 1796 (Beauchamp *et al.*, 1984).

L'atome de soufre de l'H₂S est moins polaire et plus acide que l'atome d'oxygène de l'H₂O, comme en atteste la valeur de moment dipolaire plus faible d'H₂S (0,97 D) par rapport à celle d'H₂O (1,85 D) (Cuevasanta *et al.*, 2016). Le sulfure d'hydrogène ne forme pas de liaisons

hydrogènes, il est par conséquent hydrophobe contrairement à la molécule d'eau qui possède la même structure électronique de valence. Des études de dynamique moléculaire réalisées récemment suggèrent une perméabilité membranaire (P_m) forte de l' H_2S et nettement supérieure à celles de l' H_2O (11,9 vs. $2,6 \cdot 10^{-5}$ cm/s) (Riahi et Rowley, 2014 ; Möller *et al.*, 2008).

L' H_2S possède deux protons et le premier pK_a d' H_2S , d'une valeur de 6,98 à 25°C, est proche du pH physiologique pour l'Homme (Ang *et al.*, 2012). Ainsi à pH physiologique (7,4), moins de 20% existe sous forme non-dissociée (H_2S) tandis que les 80% restant se trouvent sous forme d'anion hydrosulfure (HS^-) (Bełtowski, 2015). La troisième forme dianionique présente un pK_a estimé à environ 18,5 mais cette valeur reste approximative du fait de la contamination en polysulfures lors des mesures effectuées (Rickard et Luther, 2007). Dans la suite du manuscrit, le nom de sulfure d'hydrogène ou H_2S sera donné à toutes les espèces présentes dans le milieu aqueux (Figure 2).



Figure 2. Equilibres acido-basiques du sulfure d'hydrogène en milieu aqueux.

Le premier pK_a proche du pH physiologique est un avantage pour le passage d' H_2S à travers les membranes biologiques. En effet celles-ci sont chargées négativement ce qui constitue un environnement local de charges négatives ayant pour effet l'augmentation de ce pK_a qui se retrouve alors majoritairement sous forme neutre capable de diffuser à travers les membranes. La forme H_2S est par contre relativement inerte chimiquement à l'inverse de la forme HS^- qui est polaire et plus réactive, cette forme nucléophile étant majoritaire à l'écart des membranes (Kimura, 2015a).

De plus, le sulfure d'hydrogène est un réducteur au même titre que les espèces présentant un groupement thiolate (potentiel standard du couple $S^{2-}/H_2S = 170$ mV), mais son pouvoir réducteur est inférieur à celui des autres thiols cellulaires tels que le glutathion (GSH) et la cystéine (potentiel standard du couple $RSH/RSSR = -200$ à -300 mV) (Collman *et al.*, 2009 ; Kabil et Banerjee, 2010a).

Synthèse bibliographique

3) Les différents dérivés pouvant conduire à la libération d'H₂S

L'H₂S produit dans les cellules de mammifères est stocké en partie sous forme réduite (Stipanuk, 1986) et dans l'organisme différentes formes sont en équilibre (Shen *et al.*, 2012) (Figure 3) :

- Les formes libres de l'atome de soufre plus ou moins dissociées (H₂S, HS⁻ et S²⁻).
- Les formes associées ou séquestrées qui regroupent les persulfures (RSSH), les polysulfures (R-S_n-R), les thiosulfonates (RSO₃-S⁻), les polythionates (SO₃⁻-S_n-SO₃⁻), le thiosulfate (S₂O₃²⁻) et le soufre élémentaire contenu notamment dans les protéines (S⁰).
- Et les formes acides labiles constituées par les atomes de soufre présents dans les centres fer/soufre de certaines protéines.

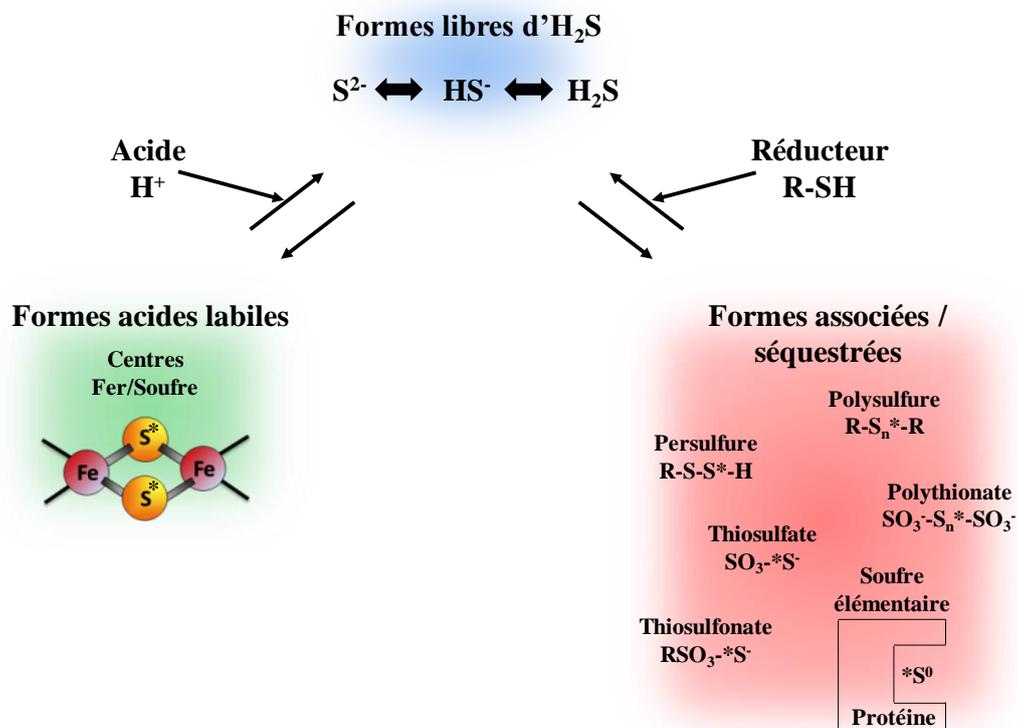


Figure 3. Représentation des différentes formes libres et associées d'H₂S (adapté de Shen *et al.*, 2012).

La notion de soufre lié ou associé a été définie en 1993 comme étant un atome de soufre fixé à un autre atome de soufre et pouvant être libéré sous forme d'anion hydrosulfure (HS⁻) par l'action d'un agent réducteur tel que le dithiothreitol (DTT), c'est le cas des formes associées/séquestrées discutées ci-dessus (Ogasawara *et al.*, 1993). Les formes acides labiles peuvent être quant à elles libérées sous forme d'HS⁻ en conditions acides, par conséquent la libération d'H₂S à partir de ces espèces est plutôt limitée dans un milieu tamponné neutre comme celui de la cellule.

4) Réactivité d'H₂S et de ses différents dérivés

a) *Rôle dans la sulfuration*

En 2009, le groupe du Dr. Snyder a proposé le premier mécanisme moléculaire expliquant certains effets physiologiques d'H₂S. Une nouvelle modification post-traductionnelle des protéines appelée « sulfhydratation » a été proposée aussi désignée par certains sous le terme de « sulfuration » qui respecte mieux la nomenclature UIPAC (Mustafa *et al.*, 2009 ; Toohey, 2012). Dans la suite du manuscrit, le terme sulfuration sera employé pour décrire cette modification post-traductionnelle.

Dans la littérature, il est admis que l'un des mécanismes d'action d'H₂S est la sulfuration mais des interrogations persistent concernant le mécanisme conduisant à cette modification chimique. L'H₂S n'est pas capable d'induire la formation d'un groupement persulfure directement sur une cystéine d'une protéine car les deux soufres possèdent le même degré d'oxydation (-2). La réaction implique donc obligatoirement un oxydant ou un dérivé oxydé de thiol, et plusieurs mécanismes sont proposés à ce jour : le premier implique l'attaque nucléophile d'HS⁻ sur un pont disulfure, ou sur un groupement acide sulfénique (S-OH), ou encore sur un groupement thiol nitrosylé (S-NO). Par conséquent ce mécanisme requiert une première étape d'oxydation du thiol ce qui permet son activation préalablement à l'attaque nucléophile. Cependant, l'H₂S est un réducteur médiocre de par son manque de réactivité et sa faible concentration dans la cellule ce qui remet en cause la pertinence de ce mécanisme dans la cellule.

A la différence de l'atome de soufre du groupement thiol, le soufre distal des espèces persulfures (RSSH) et polysulfures (RS_nH) possède un degré d'oxydation de 0 ce qui rend le transfert de soufre entre le polysulfure et le thiol possible permettant une sulfuration directe sans étape préalable d'activation (Kimura, 2016). D'ailleurs, un rôle des espèces persulfures et polysulfures dans le mécanisme de sulfuration des protéines commence à s'imposer au sein de la communauté scientifique (Figure 4).

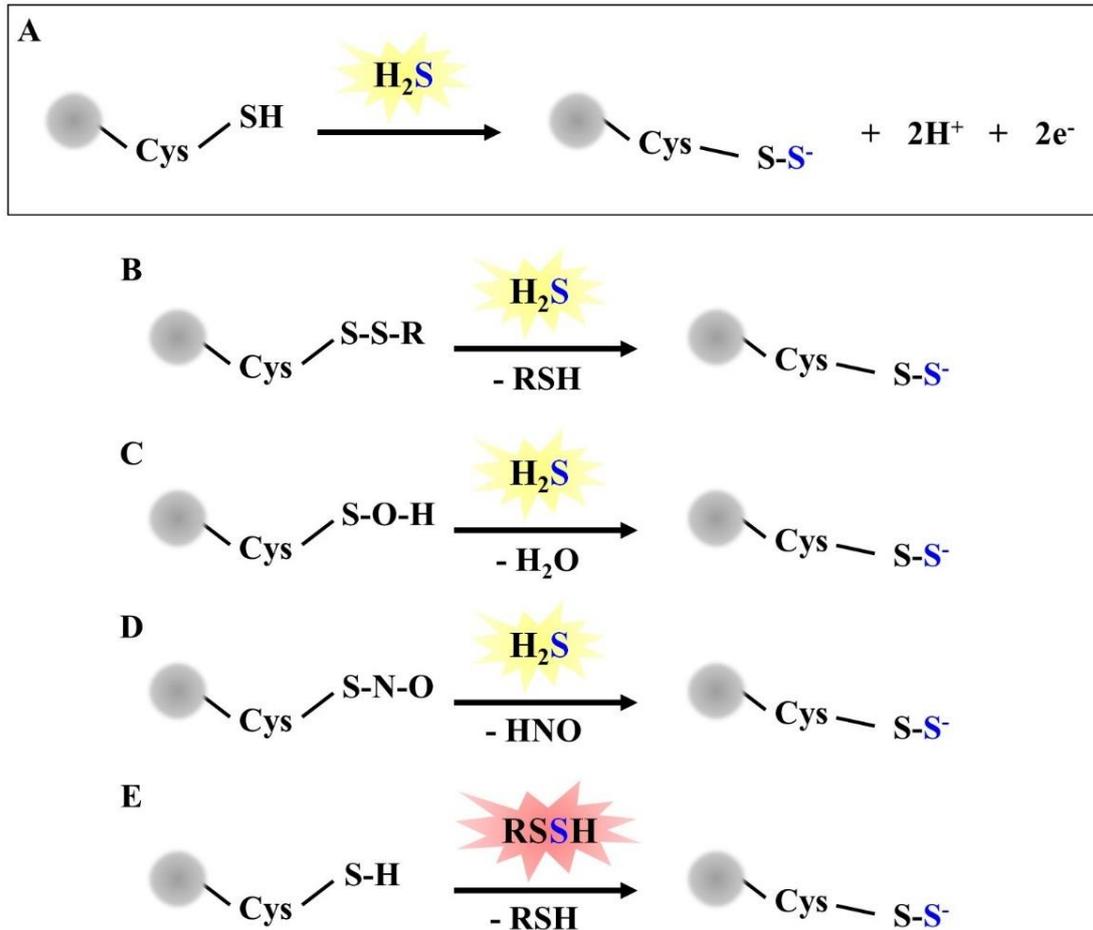


Figure 4. Les différents mécanismes permettant la sulfuration des protéines.

(A) Equation équilibrée de la réaction de sulfuration des protéines. (B) Sulfuration par activation préalable sous forme de pont disulfure. (C) Sulfuration par activation préalable du soufre sous forme d'acide sulfénique. (D) Sulfuration par activation préalable du soufre sous forme de nitrosothiol. (E) Sulfuration par réaction entre un groupement persulfure et le groupement thiol de la cystéine.

b) Rôle d'antioxydant

L' H_2S est capable de réagir avec les espèces oxydées avec des constantes de vitesse comparables à celles des autres espèces à groupement thiol de l'organisme. Cependant en considérant la faible concentration en H_2S dans la cellule comparée à des concentrations proches du millimolaire pour certains réducteurs à thiols tel que le GSH, il semblerait que cette fonction d'antioxydant d' H_2S dans la cellule soit plutôt mineure (Carballal *et al.*, 2011).

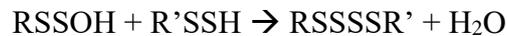
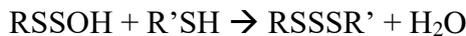
Par contre certaines espèces dérivant d' H_2S sont de meilleurs réducteurs cellulaires à l'instar des persulfures et polysulfures ($\text{RSSH}/\text{RS}_n\text{H}$) (Fukuto *et al.*, 2012). Celles-ci présentent des propriétés différentes, elles possèdent un pK_a plus faible que les espèces à thiol correspondantes ce qui augmente leur nucléophilie. Cet abaissement du pK_a est dû à l'effet alpha, qui se réfère à la réactivité accrue d'un atome nucléophile lorsqu'il est adjacent à un

atome contenant une ou plusieurs paires d'électrons non partagées (Jencks et Carriuolo, 1960 ; Edwards et Pearson, 1962). Des études modèles réalisées sur la 4,4'-dithiopyridine à pH 7,4 ont permis de montrer que l'albumine persulfure présente une réactivité vingt fois plus importante vis-à-vis d'un pont disulfure par rapport à son espèce réduite équivalente (Cuevasanta *et al.*, 2015).

Les espèces persulfures sont en outre facilement oxydables par des oxydants cellulaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), du fait de leur réactivité étant accrue.



La réaction entre un groupement thiol (R'SH) et la fonction perthiosulfénique (RSSOH) formé préalablement conduit à la formation d'H₂O et d'un polysulfure. L'espèce RSSOH est instable et peut également réagir avec une deuxième molécule de persulfure (R'SSH) ou de groupement à thiol (R'SH) pour conduire à la formation d'un polysulfure avec un soufre supplémentaire.



5) Mécanismes de formation des espèces polysulfures dans la cellule

Les polysulfures organiques (RSS_nH) tels que la glutathion persulfure/polysulfure (GSSH/GSS_nH) et la cystéine persulfure/polysulfure (CysSSH/CysSS_nH) sont présents à des concentrations décrites proches de la centaine de micromolaires pour le GSSH et proches du micromolaire pour la CysSSH (Ono *et al.*, 2014 ; Ida *et al.*, 2014). D'autres espèces proposées pour induire la sulfuration sont les polysulfures inorganiques (HSS_nH) à l'instar de l'H₂S₂ et l'H₂S₃ qui sont les espèces majoritaires identifiées dans la cellule avec des concentrations de l'ordre de la vingtaine de micromolaires (Kimura *et al.*, 2013).

Le mécanisme de production de ces espèces n'a toujours pas été clairement mis en évidence à ce jour. Il est proposé que la CysSSH soit produite par la voie de transsulfuration, la CSE conduirait à la formation de CysSSH à partir de la cystine et cette voie permettrait la production de GSSH par un mécanisme de transsulfuration. Néanmoins la formation de CysSSH à partir de cystine est en compétition avec une autre voie dans laquelle la CSE utilise

Synthèse bibliographique

la cystéine comme accepteur ce qui conduit à la production d'H₂S. Dans un milieu réducteur tel que le cytosol, la cystéine est présente en grande quantité alors que la cystine prédomine plutôt dans le milieu extracellulaire. Ainsi une étude mixte de caractérisation des propriétés cinétiques de la CSE à l'état stationnaire et de modélisation mathématique simulant un milieu physiologique, a permis de montrer que la voie de production de sulfure d'hydrogène prédominerait largement dans la cellule par rapport à la voie de formation de la CysSSH (Figure 5) (Yadav *et al.*, 2016).

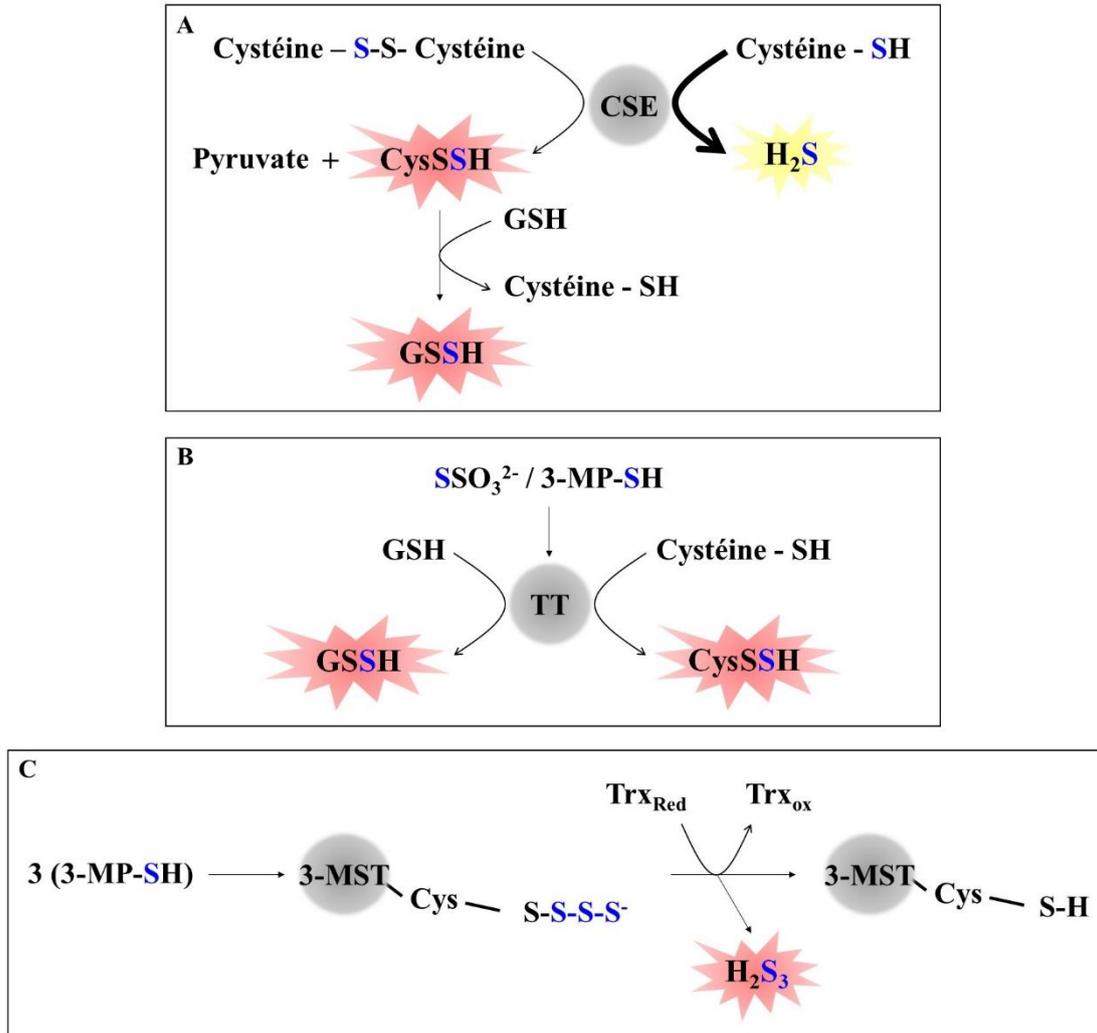


Figure 5. Les différents systèmes enzymatiques proposés pour la production de polysulfures.

(A) Voie de production de la CysSSH catalysée par la CSE, le GSSH est ensuite produit par une étape de transsulfuration entre le GSH et la CysSSH. (B) Voie de production de la CysSSH et du GSSH catalysée par les thioltransférases (TT), le soufre transféré provient du donneur de soufre qui est décrit être le 3-mercaptopyrivate (3-MP) pour la 3-MST et le thiosulfate (TS) pour les TST. (C) Voie de production des polysulfures inorganiques aussi appelés polysulfures hydrogénés. En présence d'un excès de 3-MP, la cystéine catalytique de la 3-MST fixe plusieurs atomes de soufres et l'action de la thiorédoxine conduit majoritairement à la formation d'H₂S₃.

Une alternative à la formation de ces espèces CysSSH et GSSH serait la voie impliquant les thioltransférases telles que la 3-mercaptopyrivate sulfurtransférase (3-MST) et les

thiosulfate sulfurtransférases (TST). Elles conduiraient à la formation de ces espèces par transfert de soufre d'un substrat donneur vers la cystéine ou le GSH. Néanmoins cette hypothèse repose uniquement sur la capacité qu'ont ces enzymes à catalyser des réactions de transfert de soufre sans qu'elle n'ait été validée dans des conditions physiologiques, d'ailleurs la spécificité de substrat de ces enzymes n'est pas encore clairement établie à ce jour (Yadav *et al.*, 2013). Il a été également proposé un mécanisme enzymatique de production de l'espèce H_2S_3 par la 3-MST à partir de 3-mercaptopyruvate (3-MP). En présence d'un excès de 3-MP dans la cellule, il y aurait fixation de plusieurs atomes de soufre sur la cystéine catalytique de la 3-MST. Ensuite un substrat accepteur de soufre de la 3-MST tel que la thioredoxine permettrait la libération d'espèce polysulfures inorganiques, l'espèce préférentiellement produite étant l' H_2S_3 (Kimura *et al.*, 2015b ; Shibuya *et al.*, 2009a).

Un autre groupe propose que la réaction entre le sulfure d'hydrogène et le monoxyde d'azote conduise majoritairement à pH physiologique à la formation de trois polysulfures inorganiques que sont le nitrosopersulfure ($SSNO^-$), des polysulfures inorganiques (HSS_nH) et du dinitrosulfite. Néanmoins les expériences ont été réalisées en présence de concentrations d' H_2S comprises entre 1 et 10 mM soit cent fois supérieures à la concentration maximale d' H_2S décrite dans la littérature (Cortese-Krott *et al.*, 2015).

Un dernier mécanisme proposé est la combinaison rapide des radicaux thiyle (RS^\bullet) et sulfiyle (HS^\bullet) dans des conditions oxydantes ou encore la réaction d'un radical sulfiyle (HS^\bullet) avec un thiol ce qui formerait un radical perthiyl (RSS^\bullet) qui en retour pourrait réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un persulfure et un radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Cependant ces voies seraient mineures *in vivo* en raison de la faible concentration des espèces radicalaires dans des conditions physiologiques (Das *et al.*, 1999).

II. Métabolisme d' H_2S chez les mammifères

1) Concentration intracellulaire en H_2S libre

La quantification de la concentration en H_2S libre dans la cellule est complexe de par la faible sensibilité des méthodes utilisées et/ou les biais générés par ces techniques. La

Synthèse bibliographique

concentration a de ce fait longtemps été surestimée, comme par exemple avec le bleu de méthylène. En effet, cette méthode conduisait à l'obtention de valeurs approchant la centaine de micromolaires, de telles concentrations étant improbables puisque toxiques pour la cellule (Moest, 1975). Par contre, cette technique présente l'avantage d'être sensible (de l'ordre du nanomolaire) mais elle n'est pas spécifique de l'H₂S libre puisque son utilisation nécessite une acidification du milieu entraînant la libération d'H₂S à partir des formes acides labiles.

Les électrodes à ion sulfure ont été développées à partir de 2008, et contrairement aux méthodes "classiques" cette technique est très sélective de l'H₂S libre bien qu'elle présente une sensibilité plutôt moyenne (aux alentours du micromolaire) (Whitfield *et al.*, 2008).

Des méthodes chromatographiques couplées à une gamme étalon ont également été mises au point. La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour mesurer l'H₂S libre dans des extraits cellulaires (Levitt *et al.*, 2011) et une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée après réaction entre l'H₂S et un fluorochrome tel que le monobromobimane (Shen *et al.*, 2011). Les dernières méthodes développées en 2011 consistent en l'utilisation de sondes fluorescentes, qui sont sensibles, faciles à mettre en œuvre et utilisables en routine pour l'imagerie cellulaire ou tissulaire (Lippert *et al.*, 2011).

L'évolution des techniques a permis de déterminer une valeur relativement fiable de la concentration intracellulaire globale d'H₂S, celle-ci serait comprise entre 10 nM et 3 μM chez les mammifères (Furne *et al.*, 2008 ; Levitt *et al.*, 2011 ; Kimura, 2015a ; Kimura, 2017).

2) Anabolisme d'H₂S

Ce n'est qu'en 1989 que la production endogène d'H₂S chez l'Homme et les mammifères fût mise en évidence, en particulier au niveau du système nerveux (Goodwin *et al.*, 1989 ; Warenycia *et al.*, 1989 ; Savage et Gould, 1990).

Il existe 4 systèmes principaux de production enzymatique d'H₂S, deux de ces voies conduisent à la formation d'H₂S à partir de L-cystéine et d'homocystéine par la voie de transsulfuration du métabolisme de la méthionine. Ces voies de production d'H₂S impliquent deux enzymes : la cystathionine-β-synthase (CBS) et la cystathionine-γ-lyase (CSE) (Stipanuk et Beck, 1982 ; Swaroop *et al.*, 1992).

La CBS produit l'H₂S principalement dans le cerveau, en effet cette protéine a été identifiée dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex cérébral (Robert *et al.*, 2003). La CSE est quant à elle majoritairement impliquée dans la production d'H₂S au niveau du système cardiovasculaire

mais aussi en moindre quantité au niveau du foie, des reins, des poumons et du tractus gastro-intestinal (Hosoki *et al.*, 1997 ; Fiorucci *et al.*, 2006). Ce sont des enzymes à cofacteur pyridoxal 5'-phosphate (PLP) localisées dans le cytosol (Figure 6).

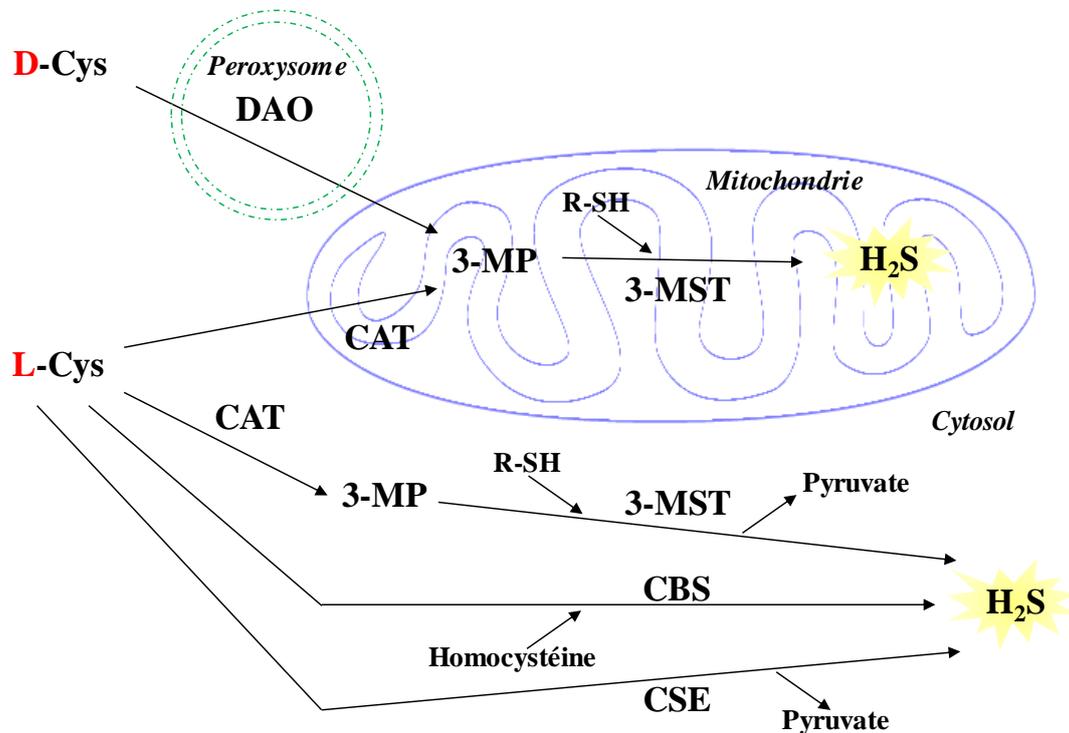


Figure 6. Description des quatre voies de production d'H₂S à partir de la cystéine chez les mammifères (adapté de Kimura, 2015b).

La réaction catalysée par la CBS est la condensation de la L-cystéine avec l'homocystéine conduisant à la formation d'H₂S. La CSE dégrade la cystéine en pyruvate, ammoniacque et H₂S. En ce qui concerne la 3-MST, elle produit l'H₂S en présence de 3-MP et d'un substrat possédant un groupement thiol. Le 3-MP peut être produit soit dans le peroxyosome par la DAO à partir de D-Cystéine soit dans le cytosol ou la mitochondrie par la CAT à partir de L-cystéine.

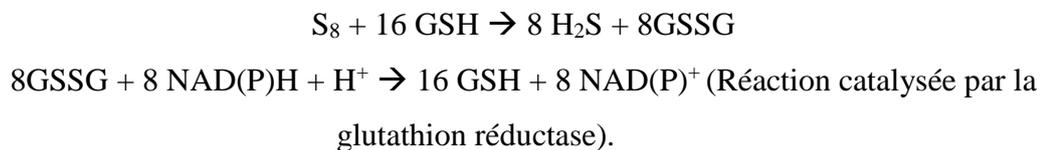
Une autre voie produisant du sulfure d'hydrogène a été identifiée plus tardivement, elle implique une enzyme appelée 3-MST (Shibuya *et al.*, 2009a). A la différence de la CBS et de la CSE, la 3-MST est une enzyme à cystéine essentielle non PLP-dépendante. La cystéine aminotransférase (CAT) transforme la L-cystéine en 3-mercaptopyruvate qui est lui-même utilisé par la 3-MST pour produire l'H₂S. La CAT et la 3-MST possèdent une double localisation cytosolique et mitochondriale ce qui permet une production d'H₂S au niveau de ces deux compartiments. La 3-MST est exprimée au niveau du système nerveux central, des cellules gliales et du bulbe olfactif (Nagahara *et al.*, 1998). L'expression de la 3-MST a été détectée également dans le muscle vasculaire lisse, les cardiomyocytes, les reins et le foie (Shibuya *et al.*, 2009a ; Módis *et al.*, 2013a).

La 3-MST peut également produire l'H₂S au niveau mitochondrial à partir de la D-cystéine. Une enzyme appelée D-aminoacide oxydase (DAO) produit du 3-MP à partir de la D-cystéine

Synthèse bibliographique

et la 3-MST catalyse la formation d'H₂S à partir du 3-MP (Shibuya *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 1998). La DAO est localisée dans les peroxysomes alors que la 3-MST est située dans la mitochondrie. La mitochondrie et le peroxysome sont des organites essentiels chez les mammifères qui échangent des métabolites variés par un transport vésiculaire (Schumann et Subramani, 2008). Par conséquent l'interaction de ces deux organites conduit à la formation de sulfure d'hydrogène à partir de la D-cystéine, cette activité ayant été détectée principalement dans le cervelet et les reins (Mitchell *et al.*, 2010).

D'autres voies mineures existent pour produire l'H₂S, car une étude a montré que les érythrocytes humains sont capables de réduire le soufre élémentaire S⁰ en H₂S par l'utilisation de réducteurs tels que le GSH, le NADH et NADPH (Searcy et Lee, 1998) selon la réaction :



De plus il est à noter que le microbiote intestinal, plus particulièrement les bactéries dites sulfato-réductrices, contribuent à la production endogène d'H₂S au niveau du tractus intestinal à partir des acides aminés soufrés, du sulfate, du sulfite et des sulfomucines présents dans l'alimentation (Gibson *et al.*, 1976 ; Roediger *et al.*, 1997). Cette voie de production enzymatique bactérienne au niveau intestinal ne sera pas développée dans ce manuscrit.

3) Catabolisme d'H₂S

Il existe deux types principaux de systèmes d'élimination d'H₂S en fonction du type cellulaire et/ou de la présence ou non de mitochondries dans la cellule.

L'étude d'organismes vivant dans des milieux riches en H₂S, comme le ver *Arenicola marina*, a permis de définir « l'unité d'oxydation du sulfure » (SOU pour « sulfide oxidation unit ») qui a également été identifiée chez les mammifères dans le foie de rat (Hildebrandt et Grieshaber, 2008). Chez ces derniers, le complexe SOU est situé au niveau de la mitochondrie dans la plupart des cellules à l'exception des cellules du système nerveux (Lagoutte *et al.*, 2010 ; Linden *et al.*, 2012) et des globules rouges, où il doit exister un système alternatif (Vitvitsky *et al.*, 2015 ; Bostelaar *et al.*, 2016). Au final, la détoxification du sulfure d'hydrogène dans la

cellule conduit majoritairement à la formation d'un produit appelé thiosulfate (Bulmer *et al.*, 2008 ; Williams *et al.*, 2003).

a) Complexe d'oxydation du sulfure (SOU)

Il a été montré que la consommation de sulfure d'hydrogène par la sulfure quinone oxydoréductase (SQOR) s'accompagne d'une réduction d'une quantité stœchiométrique d'ubiquinone et parallèlement d'une formation stœchiométrique d'un produit formant du thiocyanate en présence de cyanure, le GSSH. En présence de 1 mM de GSH, le soufre élémentaire est ainsi oxydé en thiosulfate selon un mécanisme oxygène-dépendant impliquant la SQOR, la sulfure dioxygénase (SDO) et une thiosulfate sulfurtransférase (TST) (Hildebrandt et Grieshaber, 2008). Au final pour une molécule d'oxygène moléculaire utilisée, deux moles de GSSH conduisent à la formation d'une mole de thiosulfate. Cette stœchiométrie correspondant aux quatre électrons nécessaires pour une oxydation complète du soufre élémentaire (Figure 7).

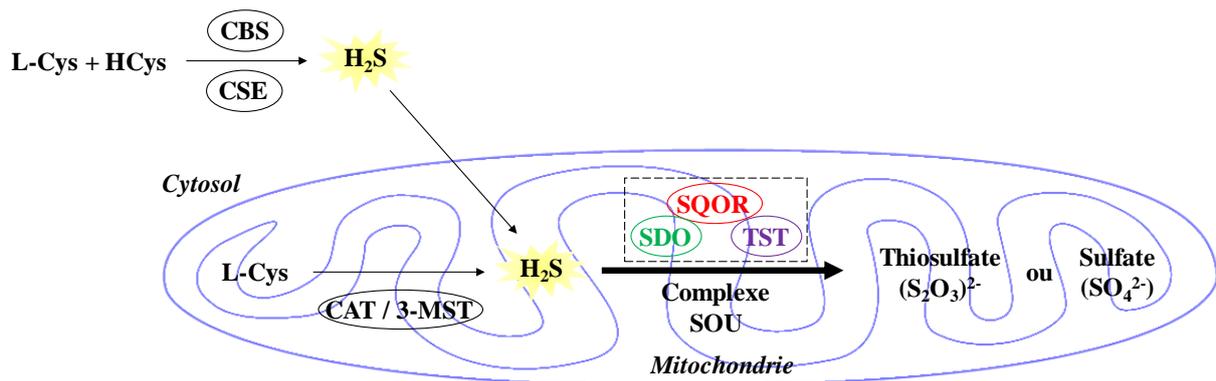


Figure 7. Catabolisme d'H₂S au niveau mitochondrial par le complexe multienzymatique hypothétique SOU (Libiad *et al.*, 2014 ; Jackson *et al.*, 2012).

Deux hypothèses sont proposées concernant l'ordre d'intervention de ces enzymes, l'identité de la TST impliquée et les sens réactionnels, ces deux propositions seront discutées dans le chapitre III de l'introduction.

b) Elimination du sulfure d'hydrogène par l'hémoglobine et la myoglobine

Les globules rouges sont des cellules dépourvues de mitochondries et par conséquent du complexe SOU, une étude a montré que l'hémoglobine est capable d'oxyder l'H₂S en thiosulfate palliant ainsi l'absence du complexe SOU (Vitvitsky *et al.*, 2015). Un système analogue a été décrit pour la myoglobine présente dans les myocytes, dans les deux cas il y a

Synthèse bibliographique

formation d'un mélange de thiosulfate et d'hydropolysulfure lié à l'atome de fer de la globine (Bostelaar *et al.*, 2016) (Figure 8).

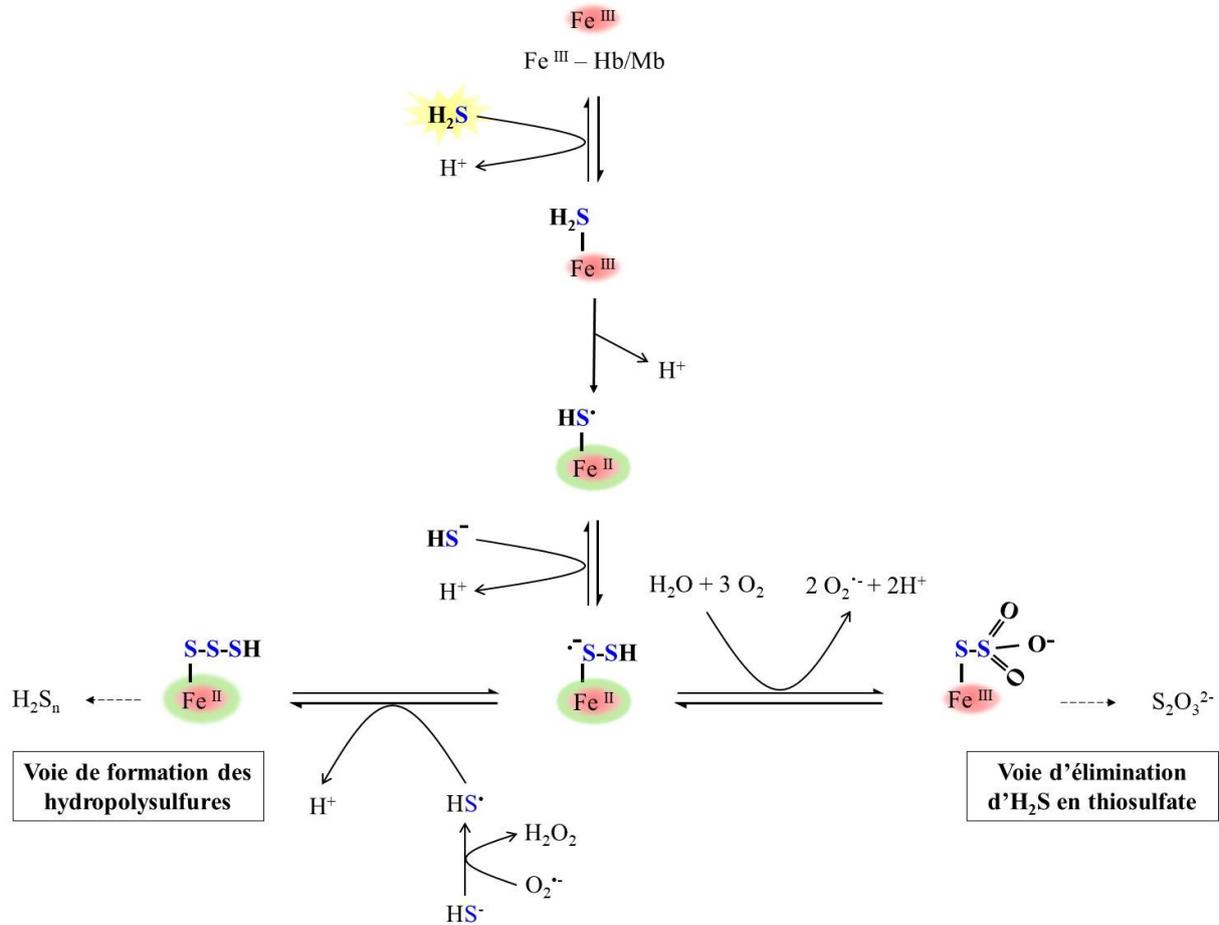


Figure 8. Voie d'élimination d'H₂S en thiosulfate par l'hémoglobine et la myoglobine (adapté de Vitvitsky *et al.*, 2015).

L'atome de fer présent dans la globine fixe deux moles d'H₂S ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire persulfure lié à cet atome de fer. Ensuite deux voies sont en compétition : la première consiste en l'oxydation du persulfure en thiosulfate ce qui permet l'élimination d'H₂S sous cette forme. L'autre voie consiste en l'attaque d'un radical sulfiyle conduisant à la formation de polysulfures hydrogénés (H₂S_n).

III. Rôles physiologiques proposés d'H₂S chez les mammifères

Dans cette partie, seront discutés uniquement les rôles majoritaires, clairement établis du sulfure d'hydrogène ainsi que de ses dérivés et pour lesquels les mécanismes ont été étudiés dans le détail.

1) Modulation de la bioénergétique mitochondriale

L'H₂S se distingue des autres gazotransmetteurs par sa capacité à être un donneur d'électrons pour la chaîne respiratoire mitochondriale à plus faible concentration (0,1-1 μM). C'est le premier substrat inorganique mis en évidence pour la chaîne respiratoire, il possède donc ainsi une fonction analogue au NADH et au FADH₂ (Gouvern *et al.*, 2007). La SQOR catalyse le transfert des électrons du sulfure d'hydrogène vers le coenzyme Q de l'ubiquinone puis les électrons sont transférés séquentiellement au complexe III puis au complexe IV conduisant à l'augmentation de la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Kabil et Banerjee, 2010b) (Figure 9).

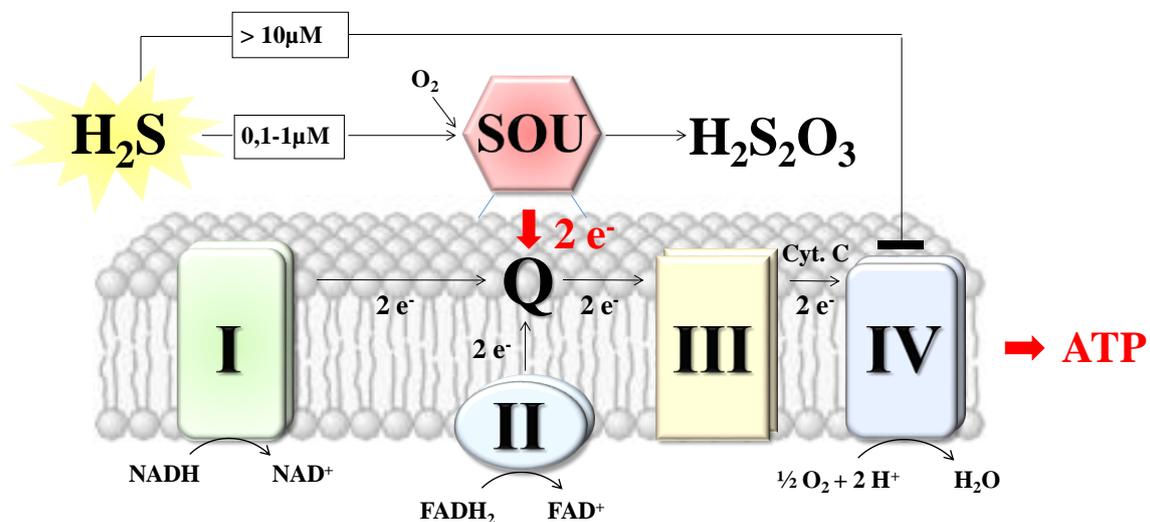


Figure 9. Stimulation de la bioénergétique mitochondriale par l'H₂S (adapté de Kabil et Banerjee, 2010b).

Selon une autre hypothèse, l'H₂S pourrait contribuer à la production d'ATP, également de manière indirecte, en réduisant les cofacteurs oxydés tels que le NAD⁺ et le FAD⁺ ce qui conduirait à une activation de la chaîne respiratoire. Comme indiqué précédemment, la 3-MST est l'enzyme principalement impliquée dans la production d'H₂S au niveau mitochondrial (Módís *et al.*, 2013a). Or, dans des conditions pathologiques particulières telles que le cancer colorectal ou en présence d'une concentration importante de calcium au niveau du muscle vasculaire lisse, la CSE et la CBS peuvent changer de compartiment par un mécanisme inconnu et passer au niveau de la mitochondrie contribuant ainsi à la production d'H₂S et par conséquent à la stimulation de la bioénergétique (Fu *et al.*, 2012 ; Teng *et al.*, 2013). Dans le cas du cancer du côlon, une étude a montré que la CBS est surexprimée ce qui conduirait à une augmentation de la production d'H₂S qui serait utilisé par les cellules cancéreuses comme source d'énergie (Szabo *et al.*, 2013). La stimulation de la chaîne respiratoire par le sulfure d'hydrogène

Synthèse bibliographique

constitue donc un soutien énergétique du métabolisme basal de la cellule, cette activation diminuant avec le vieillissement.

2) Rôle de cytoprotection

H₂S pourrait intervenir dans la protection des neurones contre un stress oxydant. Ce mécanisme de défense aurait pour origine : (1) l'activation de la γ -glutamylcystéine synthétase, conduisant à l'augmentation d'un intermédiaire de synthèse du GSH appelé γ -glutamyl cystéine ; (2) une activation du transporteur cystine/cystéine permettant l'augmentation de leur concentration intracellulaire, la cystéine étant le substrat limitant de la synthèse du GSH (Figure 10) (Kimura et Kimura, 2004).

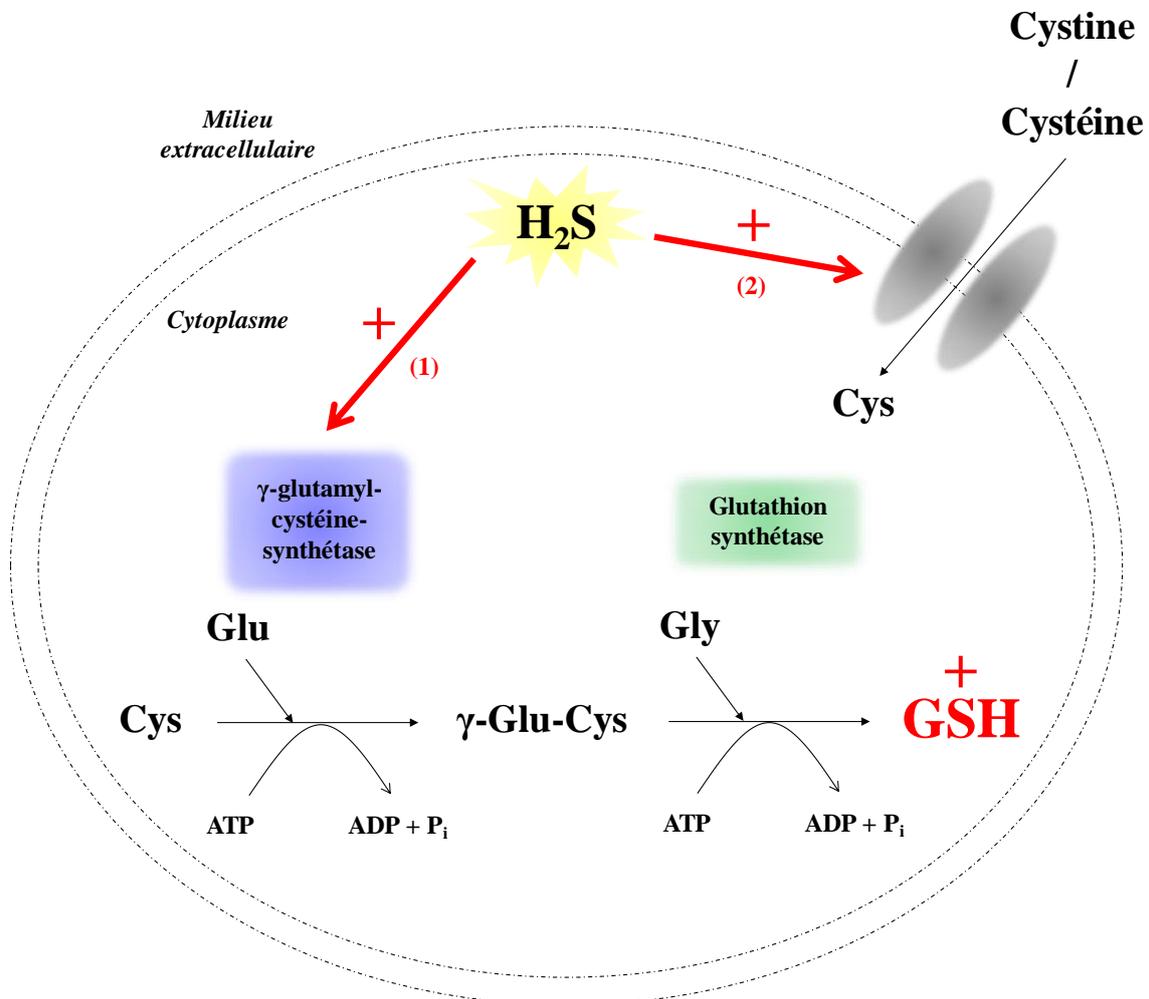


Figure 10. Mécanisme impliquant H₂S dans l'augmentation de la concentration intracellulaire de GSH.

L'augmentation de la concentration intracellulaire de GSH pourrait également être due au fait que le sulfure d'hydrogène agit en tant que réducteur dans la cellule permettant ainsi la réduction de la cystine en cystéine (Kimura *et al.*, 2010).

3) Rôle antioxydant par activation du facteur de transcription Nrf2

Le sulfure d'hydrogène induit l'augmentation de la quantité de « NF-E2 p45-related factor 2 » (Nrf2) dans le noyau, ce mécanisme a été mis en évidence par des études réalisées sur des cellules vasculaires endothéliales humaines et fibroblastiques de souris (Hourihan *et al.*, 2013 ; Cortese-Krott *et al.*, 2016). Nrf2 est un facteur de transcription de la famille des leucines zipper (bZIP) impliqué dans l'induction de l'expression de plus de cent gènes codant des protéines impliquées dans des fonctions de cytoprotection, les gènes régulés par Nrf2 étant tous sous la dépendance d'un élément de réponse antioxydant (ARE) (Hayes *et al.*, 2010). A titre d'exemple, Nrf2 active les gènes codant les protéines impliquées dans la synthèse du GSH, les protéines à thiol impliquées dans la protection contre le stress oxydant telle que la thioredoxine, ou encore les enzymes impliquées dans la production de NADPH (Kensler *et al.*, 2007 ; MacLeod *et al.*, 2009 ; Pickering *et al.*, 2012).

L'activité de Nrf2 est finement régulée dans la cellule, ce facteur est en interaction avec un adaptateur de l'ubiquitine ligase appelé « Kelch-like ECH-associated protein 1 » (Keap1). Keap1 permet lorsqu'il est fixé à Nrf2, la formation d'un complexe « Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ubiquitin ligase » (Keap1^{CRL}) permettant l'ubiquitination de Nrf2 en absence de stress cellulaire et donc sa dégradation par le protéasome (Kobayashi *et al.*, 2004). La protéine Keap1 est essentielle pour le maintien de l'homéostasie redox car elle permet d'assurer la faible durée de vie de Nrf2. L'expression des gènes sous la dépendance de l'élément de réponse ARE est donc restreinte dans des conditions d'homéostasie cellulaire. Dans ce cadre, il est proposé que le sulfure d'hydrogène provoque la sulfuration d'un résidu cystéine de Keap1. La formation de cet intermédiaire persulfure conduirait à un changement de la conformation de Keap1 conduisant à la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et donc à la translocation nucléaire de Nrf2. L'activation de la transcription des gènes *CBS*, *CTH* et *SQOR*, qui codent respectivement les enzymes CBS, CSE et SQOR impliquées dans le métabolisme d'H₂S, est alors effective. Ce mécanisme constituerait ainsi une boucle de rétroaction dans le métabolisme de cette molécule (Figure 11) (Hourihan *et al.*, 2013).

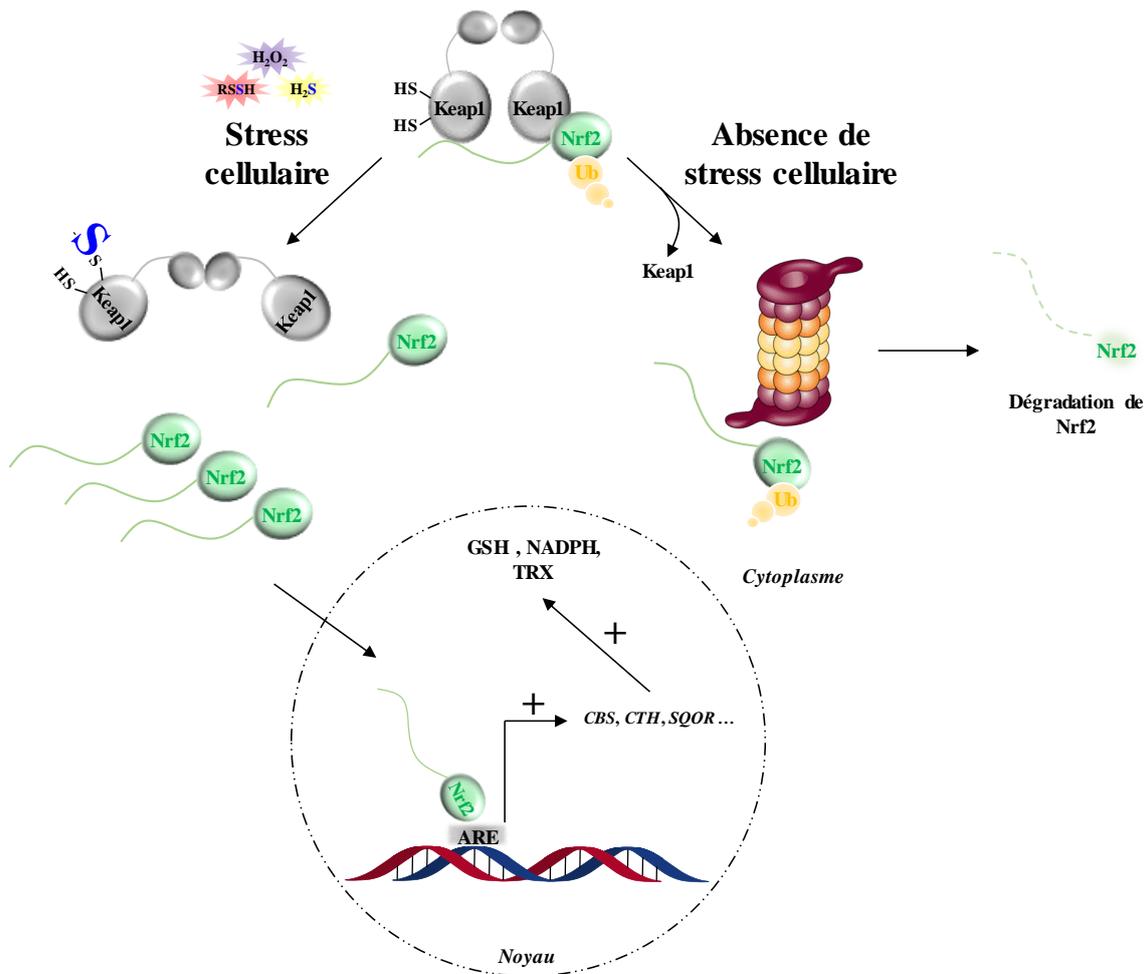


Figure 11. Mécanisme d'action d'H₂S et de ses dérivés sur le facteur de transcription Nrf2.

En absence de stress cellulaire, il y a interaction entre Keap1 et Nrf2, ce qui entraîne l'ubiquitination de Nrf2 et sa dégradation par le protéasome. En présence d'un stress cellulaire, la sulfuration de Keap1 sur une de ses cystéines provoque un changement de conformation qui entraîne la dissociation du complexe Keap1/Nrf2. Le facteur Nrf2 étant libre, il n'est plus la cible de l'ubiquitination ce qui conduit à son accumulation. Il y a translocation de Nrf2 au niveau du noyau puis activation de l'expression des gènes sous la dépendance de l'élément de réponse ARE.

4) Rôle anti apoptotique par activation du facteur de transcription NFκB

H₂S stimule la fixation du facteur de transcription NFκB sur l'ADN, ce qui conduit à un effet anti apoptotique dans la cellule. Le facteur de transcription NFκB est activé par divers agents dont le « tumor necrosis factor alpha » (TNFα). La cascade réactionnelle conduit à l'activation de la kinase IκB (IKK) ce qui provoque la phosphorylation de la protéine IκB conduisant à sa dégradation et à la libération de NFκB (Delhase *et al.*, 1999 ; Karin et Ben-Neriah, 2000). Il y a ensuite translocation du facteur de transcription NFκB dans le noyau, l'activité nucléaire de cette protéine étant régulée par de nombreux facteurs à l'instar de la protéine « ribosomal protein S3 » (RPS3). Le mécanisme responsable de l'effet anti apoptotique d'H₂S passerait par la sulfuration d'une des cystéines de la sous-unité p65 ce qui

favoriserait sa fixation à la protéine RPS3. Or RPS3 est un facteur indispensable à la fixation de l'hétérodimère p65-p50 sur l'ADN (Figure 12) (Wan *et al.*, 2007).

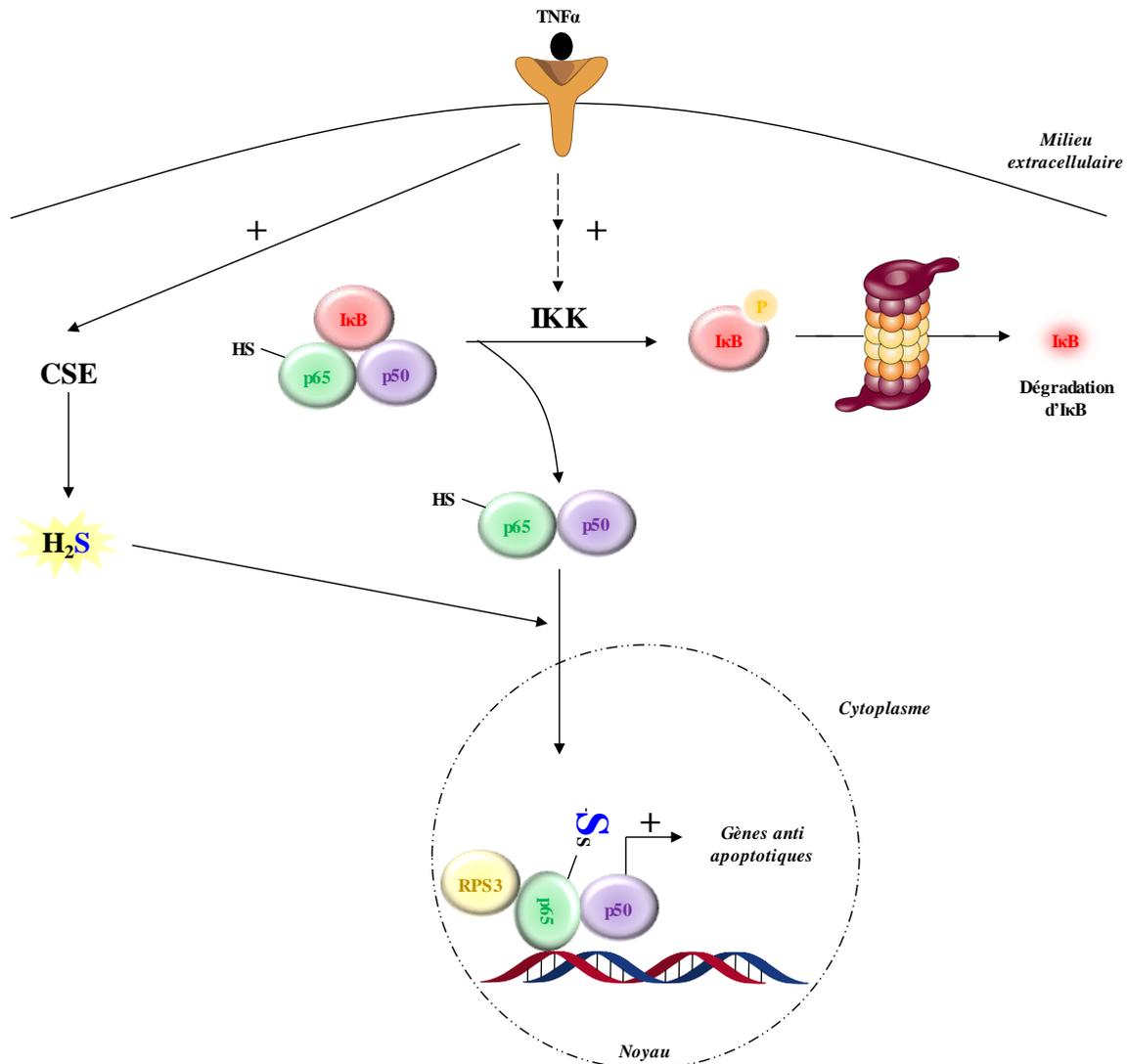


Figure 12. Mécanisme d'action d'H₂S sur le facteur de transcription NFκB.

L'activation du TNFα suite à la fixation de son ligand conduit à une cascade réactionnelle provoquant la phosphorylation de IκB par la kinase IKK, la phosphorylation d'IκB provoquant son élimination par le protéasome. Parallèlement l'activation du récepteur TNFα stimule la production d'H₂S par la CSE et le complexe p65-p50 une fois libre subit une sulfuration sur l'une des cystéines de p65. Cette modification entraîne un changement de conformation ce qui permet le recrutement d'un facteur de régulation appelé RPS3 dans le noyau. La formation du complexe à trois partenaires favorise la fixation de p65 sur l'ADN ce qui permet l'activation des gènes codant les protéines anti apoptotiques.

5) Rôle vasodilatateur et pro angiogénique

H₂S a un effet de vasodilatateur sur les cellules musculaires lisses vasculaires, cet effet étant identique à celui du monoxyde d'azote (Hosoki *et al.*, 1997). Dans la littérature, il est

Synthèse bibliographique

décrit que l'administration d'H₂S provoque de manière immédiate une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

L'effet vasodilatateur d'H₂S serait lié à son action sur les canaux K_{ATP} présents au niveau des sarcolemmes des cellules musculaires lisses vasculaires qui composent les vaisseaux sanguins. Les canaux K_{ATP} sont composés de deux types de sous-unités : la sous-unité Kir qui forme le canal et la sous-unité SUR qui régule son ouverture. Il est proposé qu'H₂S clive un pont disulfure de la sous-unité SUR des canaux K_{ATP} entraînant leur ouverture et un efflux de potassium. Or cet ion est responsable de la repolarisation membranaire, il en résulte une relaxation des cellules constituant les vaisseaux sanguins et par conséquent une diminution de la pression artérielle (Zhao *et al.*, 2001).

La relaxation des cellules musculaires des vaisseaux sanguins aurait également pour origine l'inhibition de l'entrée du calcium dans le sarcoplasme. Or l'influx de Ca⁺⁺ provenant du réticulum sarcoplasmique grâce aux canaux calcium de type L joue un rôle crucial dans le couplage excitation/contraction de la cellule musculaire. Des études menées sur des cardiomyocytes de rat ont d'ailleurs montré que l'ajout exogène d'H₂S conduit à une inhibition de l'ouverture des canaux calcium de type L. Ce mécanisme empêche ainsi la sortie du Ca⁺⁺ du réticulum sarcoplasmique produisant ainsi la vasodilatation (Sun *et al.*, 2008).

Le sulfure d'hydrogène est par ailleurs un stimulateur endogène de l'angiogenèse, comme cela a été montré après traitement de cellules endothéliales (Papapetropoulos *et al.*, 2009). L'activation du récepteur au « vascular endothelial growth factor » (VEGF) conduit à une augmentation de la concentration en Ca⁺⁺ dans la cellule, provoquant l'activation de la CSE qui en retour produit de l'H₂S. Le mécanisme moléculaire expliquant l'effet pro angiogénique d'H₂S passe par une activation de l'axe PI-3K/Akt et une augmentation de la phosphorylation des protéines de la voie des MAPK (extracellular signal regulated kinase (ERK)1/2 et p38). L'activation de ces protéines est due à deux mécanismes distincts : (1) l'activation de l'enzyme NO-synthase endothéliale (eNOS) qui conduit à l'augmentation de la production de NO induisant la hausse de la concentration en GMPc ; (2) l'inhibition par H₂S de la phosphodiesterase 5A (PDE5A) ce qui conduit également à l'augmentation de la concentration de GMPc. Or une forte concentration de GMPc permet une activation de la protéine kinase G (PKG) qui stimule les protéines de la voie des MAPK par phosphorylation (Figure 13) (Coletta *et al.*, 2012).

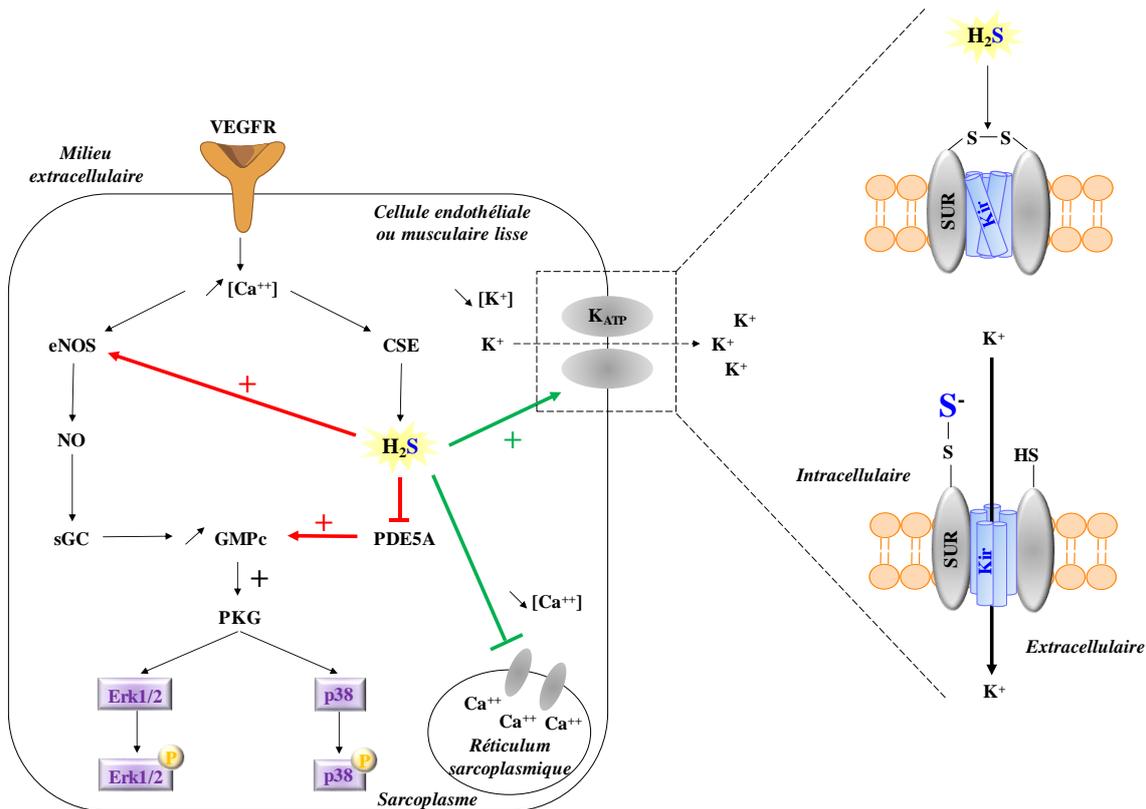


Figure 13. Mécanisme de régulation du système cardiovasculaire par l'H₂S (adapté de Coletta et al., 2012 ; Wang, 2012 ; Osmond et Kanagy, 2014).

L'activation du récepteur VEGF conduit à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire qui stimule la CSE et entraîne une augmentation de la production d'H₂S. Celui-ci active les canaux K_{ATP} et inhibe les canaux calcium de type L provoquant une vasodilatation. D'autre part l'H₂S active l'enzyme eNOS et inhibe la PDE5A conduisant à une augmentation de la quantité de GMPC. Celui-ci active la PKG provoquant l'activation de la voie des MAPK menant ainsi à un effet pro angiogénique.

6) Rôle dans l'apprentissage et la mémorisation

L'un des rôles attribués à H₂S est celui de messenger neuronal, en effet à des concentrations physiologiques il conduit à l'activation des récepteurs « N-méthyl-D-aspartic acid » (NMDA) et facilite la potentialisation à long terme (LTP) au niveau de l'hippocampe (Abe et Kimura, 1996). Des expériences ont montré que la réduction d'un pont disulfure par le dithiothréitol au niveau d'une zone charnière d'un domaine de liaison au ligand des récepteurs NMDA améliore leur activité (Aizenman et al., 1989). L'H₂S augmenterait donc l'activité des récepteurs NMDA parallèlement à une stimulation tétaïque faible, par réduction d'un pont disulfure situé sur le récepteur NMDA.

Un autre mécanisme expliquant la LTP passe par le récepteur TRPA1. L'activation de ces récepteurs provoque un influx calcique permettant la libération de la D-sérine, un gliotransmetteur impliqué dans l'activation des récepteurs NMDA (Shigetomi et al., 2013).

Synthèse bibliographique

L'action d'H₂S sur les récepteurs NMDA et TRPA1 provoque donc une potentialisation à long terme au niveau des cellules situées dans l'hippocampe permettant une optimisation de l'apprentissage et de la mémoire (Figure 14).

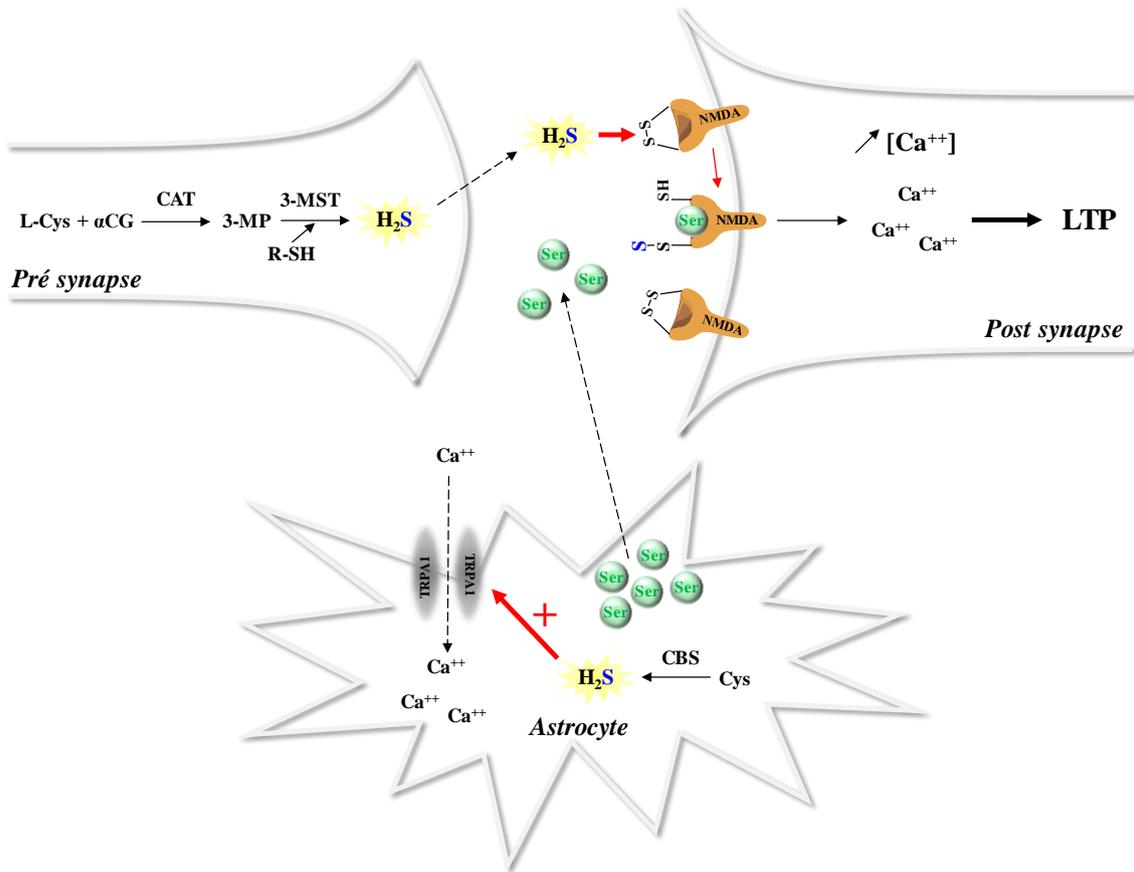


Figure 14. Mécanisme d'action d'H₂S au niveau du système nerveux (Kimura, 2015b).

L'H₂S produit au niveau pré synaptique par la 3-MST réduit le pont disulfure du récepteur NMDA au niveau de la fente synaptique ce qui permet son activation. Parallèlement le récepteur NMDA est activé par la D-sérine (D-Ser) qui est libérée au niveau de la fente synaptique suite à l'activation des canaux TRPA1 par l'H₂S produit par la CBS dans les astrocytes. L'activation du récepteur NMDA conduit à l'induction d'un LTP conduisant à un phénomène de mémorisation et d'apprentissage.

7) Rôle de protection des photorécepteurs

L'H₂S protège également la rétine contre le stress oxydant. Or la rétine est sensible à ce type de stress en raison de sa forte consommation en oxygène et son exposition quotidienne à la lumière qui si elle est excessive, conduit à une dégénérescence des photorécepteurs, dont la mort est une conséquence irréversible causée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Lorsque les cellules photo réceptrices de la rétine sont exposées à la lumière, la concentration intracellulaire de Ca⁺⁺ est diminuée ce qui active la voie de production d'H₂S par le système CAT/3-MST en levant l'inhibition de la CAT par le Ca⁺⁺. A l'inverse, en absence de lumière,

la concentration intracellulaire de calcium est augmentée ce qui conduit à une inhibition de la production d'H₂S suite à l'inhibition de la CAT.

D'autre part, l'H₂S inhibe les canaux calciques de type L dans les photorécepteurs par l'activation de l'ATPase vacuolaire présente dans les cellules horizontales ce qui permet le maintien de faibles concentrations en Ca⁺⁺ dans les cellules photo réceptrices. De façon plus globale, l'H₂S ainsi produit a pour rôle principal la diminution de la concentration intracellulaire en ROS par l'augmentation de la production de GSH (Figure 15) (Mikami et Kimura, 2012).

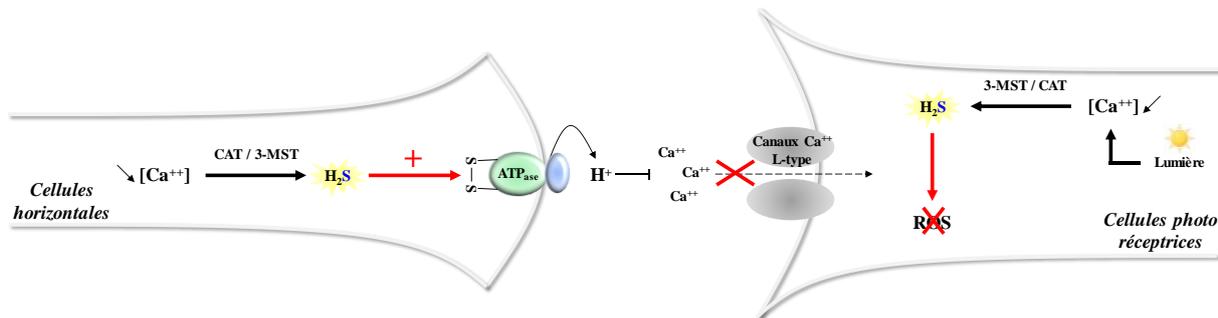


Figure 15. Mécanisme de protection des cellules photo réceptrices par l'H₂S (adapté de Mikami et Kimura, 2012).

Lorsque les photorécepteurs sont exposés à la lumière, la membrane est hyper polarisée. La concentration intracellulaire en Ca⁺⁺ dans les cellules photo réceptrices diminue jusqu'à une valeur proche de 10 nM ce qui active le système de production d'H₂S par levée de la répression de la CAT. D'autre part, le sulfure d'hydrogène active l'ATPase vacuolaire dans les cellules horizontales provoquant la libération d'ions H⁺ et réprimant ainsi les canaux calciques de type L. Par ce mécanisme, l'H₂S permet le maintien d'une faible concentration intracellulaire de Ca⁺⁺. Enfin, l'H₂S produit dans les cellules photo réceptrices leur procure une protection contre les ROS par augmentation de la concentration en GSH.

8) Rôle de protection de l'articulation

Dans la littérature, il est décrit que l'H₂S produit par la CSE et la CBS atténue l'effet de l'interleukine pro inflammatoire IL1β (Ha *et al.*, 2015). Or l'inflammation est un des symptômes observés dans l'arthrose, une maladie dégénérative induisant une douleur intense au niveau des articulations (Arden et Leyland, 2013 ; Fox *et al.*, 2012). Cette activité anti-inflammatoire d'H₂S est médiée par l'inhibition de l'activité de la NO synthase (iNOS), de l'expression de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2), de la prostaglandine E2 (PGE₂) et de l'enzyme « Matrix Metallopeptidase » (MMP-13) par suppression de la voie ERK1/2 et NFκB (Burguera *et al.*, 2016). COX-2 est le médiateur majeur impliqué dans la douleur lors d'une inflammation, son inhibition pourrait ainsi expliquer l'effet anti nociceptif d'H₂S (effet comparable à celui observé pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)) (de Boer *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009). Ainsi l'apport exogène d'H₂S pourrait être une stratégie

Synthèse bibliographique

thérapeutique pour atténuer les symptômes, et servir d'analgésique puissant comme cela a déjà été montré pour le système gastro intestinal (Distrutti *et al.*, 2006). Les MMPs sont synthétisées par les synoviocytes et les chondrocytes et parmi les nombreuses MMP qui interviennent dans la dégradation de la matrice cartilagineuse, la MMP-13 est considérée comme jouant un rôle majeur dans la dégradation du collagène et des agrécanes. Le sulfure d'hydrogène diminue ainsi la destruction des hélices de collagène du cartilage en bloquant l'expression de la MMP-13, cet effet passerait par un mécanisme de suppression du stress oxydatif dans le chondrocyte (Figure 16) (Vacek *et al.*, 2013).

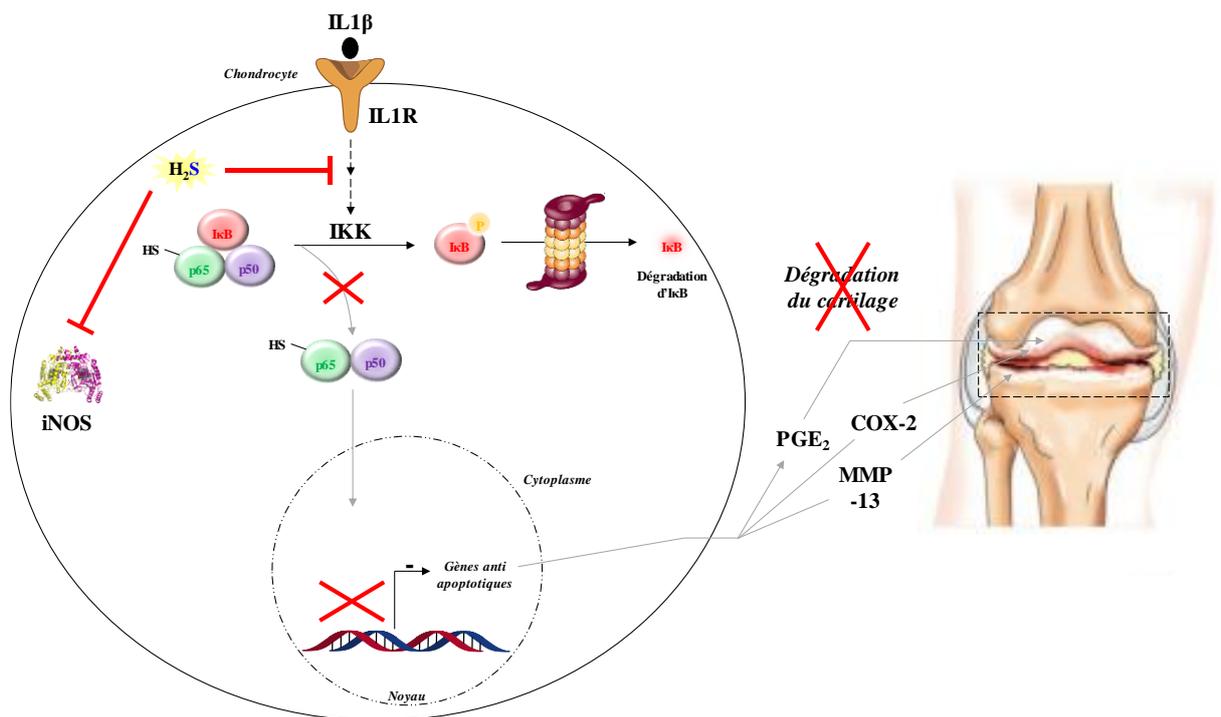


Figure 16. Mécanisme de protection des chondrocytes par l'H₂S (Adapté de Rasheed *et al.*, 2016).

Le sulfure d'hydrogène inhibe l'activité de la iNOS et des voies ERK1/2 et NFκB ce qui conduit à une inhibition de l'expression des gènes codant la COX-2 et la PGE₂ diminuant ainsi la douleur au niveau du cartilage. De plus l'inhibition de la voie NFκB par l'H₂S inhibe l'expression du gène codant la MMP-13 diminuant ainsi la dégradation du cartilage par cette enzyme.

9) Thérapeutiques à base de donneurs lents d'H₂S et d'inhibiteurs de synthèse

Un nouveau champ de recherche s'est ouvert depuis quelques années concernant la mise au point de nouveaux médicaments visant à délivrer l'H₂S ou à supprimer sa production endogène. Dans ce contexte, la société « Ikaria Therapeutics » a tenté d'utiliser le Na₂S pour des applications de soins critiques telle que la réduction des lésions myocardiques suite à un infarctus par exemple. Les essais cliniques de cette nouvelle molécule thérapeutique ont cependant été stoppés, *a priori* à cause d'un apport trop rapide d'H₂S.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs autres entreprises ont cherché à exploiter la puissante action anti-inflammatoire et cytoprotectrice d'H₂S, le but étant de mettre au point des molécules capables de le libérer lentement. A titre d'exemple, les entreprises « Antibe Therapeutics Inc. », « CTG Pharma » et « Sulphydis » ont développé des molécules chimiques capables de libérer l'H₂S dans l'organisme pour remplacer les dérivés d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) actuellement sur le marché. Les principales cibles de ces médicaments sont la douleur et l'inflammation avec pour avantage la réduction de l'ulcération gastro-intestinale couramment causée par les autres AINS.

Une autre application thérapeutique de ces médicaments est le traitement et la chimio-prévention de certains cancers (par exemple de la prostate ou colorectal), ces médicaments ont montré leur efficacité aussi bien dans les modèles *in vitro* que dans les modèles animaux et ils présentent l'avantage de provoquer des effets gastro-intestinaux réduits (Chattopadhyay *et al.*, 2012 ; Kashfi, 2014).

De nombreux médicaments libérant l'H₂S sont en cours de développement pour notamment réduire le stress oxydatif dans l'organisme. Ces médicaments se composent de deux parties : l'une permettant la libération d'H₂S en présence de réducteurs cellulaires tels que le GSH et l'autre permettant d'adresser ces molécules à la mitochondrie. L'apport d'H₂S permet d'augmenter la bioénergétique mitochondriale et de réguler les processus de mort cellulaire par son action antioxydante. Les molécules NBS-1120 et AP39 ont ainsi été élaborés pour prévenir certains cancers, réduire le stress oxydatif et atténuer l'inflammation.

Des études précliniques réalisées sur des modèles animaux présentant une insuffisance cardiaque ont confirmé que l'utilisation de donneurs lents d'H₂S tel que la molécule SG-1002 est efficace pour (1) diminuer la taille de l'infarctus, (2) améliorer les fonctions cardiaques, (3) augmenter l'angiogénèse et (4) diminuer l'inflammation et le stress oxydatif après l'infarctus. Un essai de phase I du médicament SG-1002 a permis de montrer une augmentation du taux plasmatique d'H₂S sans pour autant qu'il n'y ait d'effets secondaires majeurs.

A l'inverse, certaines équipes cherchent à diminuer la production endogène lorsque la concentration en H₂S dans l'organisme est trop importante. C'est le cas de la société « Sova Pharmaceuticals » qui développe des inhibiteurs de CSE faisant l'objet d'un brevet pour les troubles respiratoires et métaboliques (WO 2014018571 A2, Stein *et al.*, 2016).

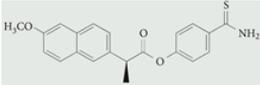
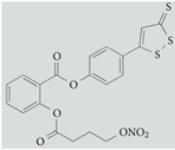
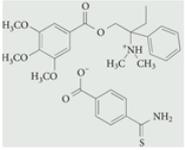
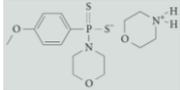
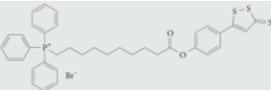
En effet, un rôle d'H₂S dans la résistance de bactéries pathogènes aux antibiotiques a été démontré (Shatalin *et al.*, 2011) car l'inactivation des gènes codant la CBS, la CL ou la 3-MST, qui conduit à la suppression de la production d'H₂S, les rend hautement sensibles à de nombreux

Synthèse bibliographique

antibiotiques. Ce rôle est conforté par le fait qu'un apport exogène d'H₂S supprime cet effet. Ainsi, la réduction de la production endogène d'H₂S pourrait augmenter la sensibilité des bactéries pathogènes à l'action des antibiotiques. Un brevet a d'ailleurs été déposé concernant le ciblage des enzymes le produisant (Tableau 1) (WO 2012106469 A3, Nudler et Shatalin, 2012).

Tableau 1. Molécules à potentiel thérapeutique en cours de développement dont l'action repose sur l'apport exogène d'H₂S ou l'inhibition de sa production endogène (Adapté de Wallace et Wang, 2015).

Dans chacune des colonnes sont montrés de gauche à droite l'entreprise qui développe le produit, la structure chimique de la molécule, la pathologie que cible le médicament, le code de désignation de la molécule et le stade de développement dans les phases de tests cliniques.

Entreprise	Structure chimique	Indication clinique	Désignation du médicament	Stade de développement
Antibe Therapeutics (Toronto, Canada)		Ostéoarthrite	ATB-346	Phase I
		Douleur	ATB-352	Préclinique
		Douleur / vétérinaire	ATB-338	Préclinique
		Thromboses	ATB-350	Préclinique
City University of New York		Cancer	NBS-1120	Préclinique
Gicare Pharma (Montreal, Canada)		Douleur / colon	GIC-1001	Phase II pour analgésies au cours de la coloscopie
National University of Singapore		Hypertension, Inflammation, Cancer	GYY4137	Non communiqué
Sova Pharmaceuticals (Californie, USA)	Non communiqué	Douleur, disfonctionnement métabolique	Inhibiteur de la CSE	Non communiqué
SulfaGENIX (New Orleans, USA)		Stress oxydant	SG-1002	Phase II pour les défaillances cardiaques
University of Exeter (UK)		Inflammation, stress oxydant	AP39	Préclinique

Chapitre II. Les thioltransférases à domaine rhodanèse

Les thioltransférases à domaine rhodanèse sont des enzymes à cystéine essentielle qui catalysent une réaction de transfert de soufre d'un substrat donneur vers un substrat accepteur.



Dans la suite du manuscrit, le terme thioltransférase fera référence aux enzymes de la famille des thioltransférases à domaine rhodanèse.

I. La superfamille des protéines à domaine rhodanèse

Les 3-MST et les TST font parties des protéines à domaine rhodanèse. C'est un module structural ubiquitaire présent dans les trois règnes du vivant. Ce repliement se caractérise par la présence d'un feuillet β central constitué de 5 brins, celui-ci étant flanqué de 4 à 5 hélices α . Le séquençage de plus de 80 génomes a permis de montrer que le domaine rhodanèse est très répandu, avec plus de 500 gènes codant potentiellement un tel domaine (Hofmann *et al.*, 1998). De plus, il peut être retrouvé dans plusieurs protéines codées par un même génome, comme c'est le cas pour le génome humain avec 47 protéines possédant au moins un domaine rhodanèse contre 7 pour la souche K12 d'*Escherichia coli* (Tatusov *et al.*, 2000).

La réalisation d'alignements multiples, *via* l'utilisation du serveur SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), a conduit à une classification des protéines à domaine rhodanèse en quatre sous-familles en fonction du nombre de domaines rhodanèses et de la présence ou non de domaines additionnels (Bordo et Bork, 2002 ; Cipollone *et al.*, 2007). Il est à noter que les 3-MST et TST appartiennent aux trois premières sous-familles.

La première sous-famille est caractérisée par la présence d'un seul domaine rhodanèse, et regroupe majoritairement des TST, comme par exemple les deux TST d'*E. coli* que sont la GlpE cytoplasmique et la PspE périplasmique ou encore la TSTD1 humaine. Ces protéines à un seul domaine rhodanèse sont associées à la réponse à un stress cellulaire ou à des processus de sénescence chez les plantes (Adams *et al.*, 2002a ; Azumi et Watanabe, 1991). Par contre, certaines protéines retrouvées essentiellement chez les eucaryotes, comme les MAPK-

Synthèse bibliographique

phosphatases et des ubiquitine hydrolases, possèdent un domaine rhodanèse mais pas de résidu cystéine catalytique (Fauman *et al.*, 1998 ; Hofmann *et al.*, 1998).

La seconde sous-famille se caractérise par la présence de deux domaines rhodanèses, et les membres de cette sous-famille sont majoritairement des thioltransférases telles que la TST humaine appelée Rhodanèse et les 3-MST humaine et bactérienne. Dans ces enzymes, un seul domaine rhodanèse est actif (le domaine C-terminal), la cystéine catalytique étant remplacée par une asparagine ou une glycine dans le domaine inactif (Bordo et Bork, 2002).

La troisième sous-famille se caractérise par la présence d'un domaine rhodanèse associé à un ou plusieurs autres domaines structuraux. Elle regroupe différentes 3-MST comme l'enzyme de *Trypanosoma brucei* dans laquelle le domaine C-terminal est de type thiorédoxine (Trx) (Yadav *et al.*, 2013), et la protéine ThiI d'*E. coli* impliquée dans la biosynthèse de molécules soufrées telles que la thiamine ou encore dans les processus de modifications des ARNt pour former la 4-thiouridine (Mueller *et al.*, 2001). Un autre exemple concerne la protéine YbbB d'*E. coli* impliquée dans la synthèse de la sélénouridine. Cette protéine est le seul membre de la famille des rhodanèses capable de catalyser la dernière étape de la biosynthèse de la 2-sélénouridine, une base azotée présente à la position « wooble » et dont la fonction est inconnue (Wolfe *et al.*, 2004 ; Cipollone *et al.*, 2007). Un domaine rhodanèse peut également être situé dans la partie C-terminale de ThiF/MoeB qui constitue un système impliqué potentiellement dans la biosynthèse des protéines à molybdène (Cortese *et al.*, 2002 ; Matthies *et al.*, 2005).

Enfin, la quatrième sous-famille regroupe les phosphatases Cdc25 et se caractérise par la présence d'une boucle plus longue (7 résidus contre 6 pour les autres rhodanèses) au niveau du site actif (Bordo et Bork, 2002). Dans cette famille est également retrouvée l'arsenate réductase Arc2p de *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 17).

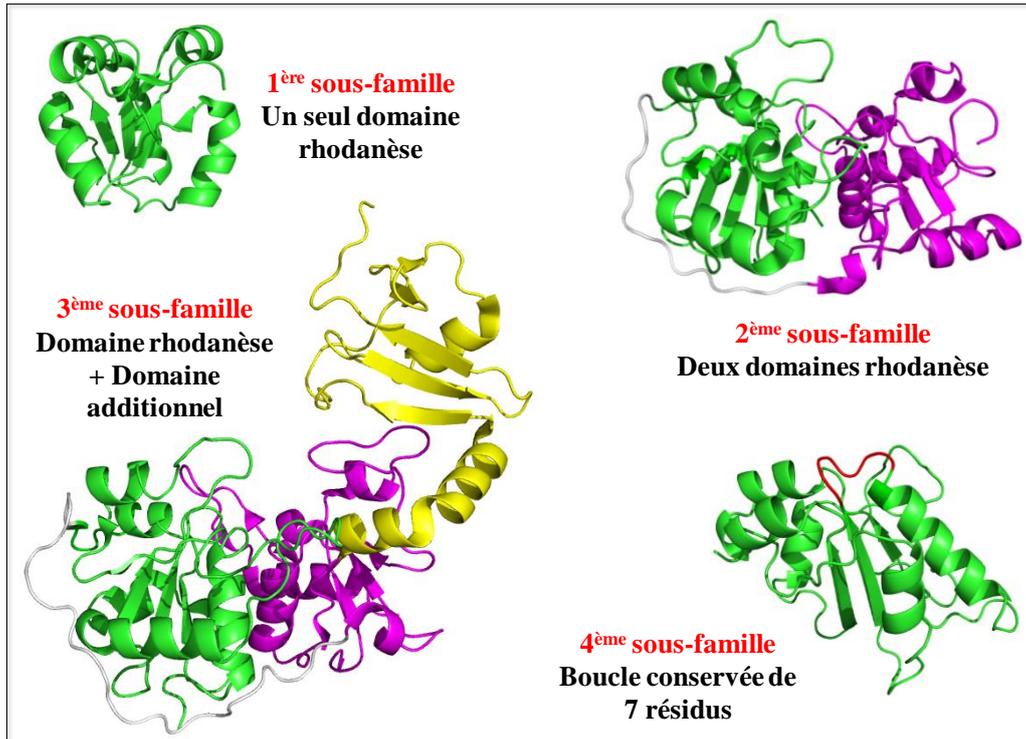


Figure 17. Classification structurale des protéines à domaine rhodanèse.

Les protéines à domaine rhodanèse sont classées en quatre sous-familles en fonction du nombre de domaines rhodanèses et de la présence ou non de domaines additionnels. Chaque sous-famille est illustrée par un exemple : 1) la GlpE d'*E. coli* (1GMX), 2) la 3-MST d'*E. coli* (1URH), 3) la 3-MST de *L. major* (1OKG), et 4) la phosphatase humaine Cdc25A (1C25). Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol (Shrödinger Inc.) à partir des fichiers pdb cités ci-dessus. Le premier domaine rhodanèse est en vert, le deuxième domaine rhodanèse est représenté en violet, le domaine additionnel en C-ter apparaît en jaune, les jonctions entre les deux domaines rhodanèses sont représentés en blanc et la boucle conservée de 7 résidus apparaît en rouge.

Dans la suite de l'état de l'art, seules les 3-MST et les TST seront décrites en détail puisque ces enzymes ont été étudiées dans le cadre du projet de thèse.

II. Structure tridimensionnelle des 3-MST et TST

1) Structure des 3-MST

La numérotation utilisée dans ce manuscrit concernant les 3-MST est celle de l'enzyme d'*Escherichia coli*, la méthionine N-terminale étant absente. Les 3-MST possèdent les séquences signatures caractéristiques des protéines à domaine rhodanèse, à savoir : [A/V]-x(2)-[F/Y]-[D/E/A/P]-G-[G/S/A]-[W/F]-x-E-[F/Y/W] du côté N-terminal et [F/Y]-x(3)-H-[L/I/V]-

Synthèse bibliographique

P-G-A-x(2)-[L/I/V/F] en C-terminal. De plus, la cystéine catalytique des 3-MST est présente dans la séquence conservée C-G-[S/T]-G-[V/I]-T-A (Figure 18) (Spallarossa *et al.*, 2004).

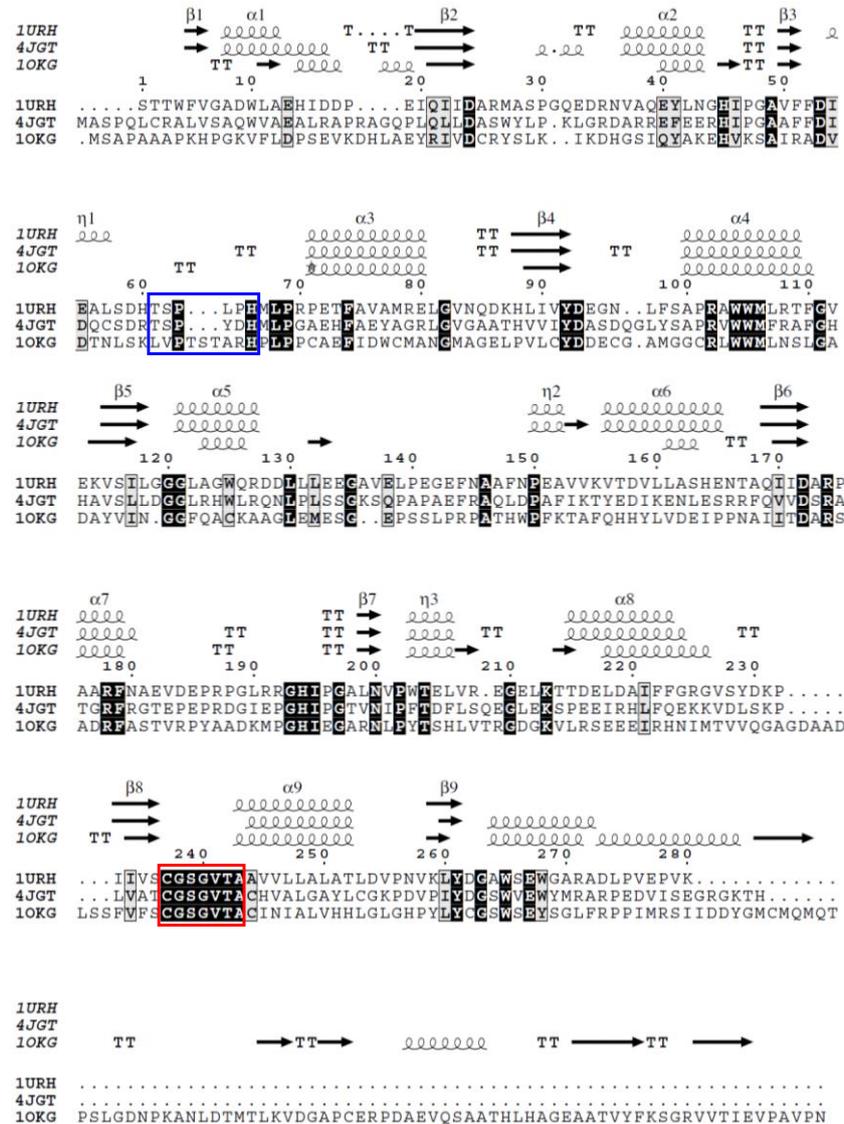


Figure 18. Alignement des séquences protéiques et des structures secondaires des 3-MST d'*E. coli* (1URH), humaine (4JGT) et de *L. major* (10KG).

Les résidus invariants sont indiqués sur fond noir et ceux présentant des propriétés similaires sont encadrés en gris. L'alignement a été réalisé à l'aide des logiciels ClustalW et Esript 3,0 hébergés sur le serveur du Pole Bioinformatique Lyonnais. Les structures secondaires hélice α (spirale), brin β (flèche) et boucle (TT) sont représentées au-dessus de l'alignement de séquences. La boucle 61-66 est encadrée en bleu tandis que la boucle catalytique conservée 237-243 est entourée en rouge.

A ce jour, quatre structures tridimensionnelles de 3-MST ont été résolues par diffraction aux rayons X : la 3-MST d'*E. coli* (Spallarossa *et al.*, 2004), celle de *Leishmania major* (Alphey *et al.*, 2003), et l'enzyme humaine sous forme libre et de complexe avec du pyruvate (Yadav *et al.*, 2013). La 3-MST est un monomère dont le repliement est conservé dans toutes les structures. Ce repliement est constitué de deux domaines rhodanèses, dont seul le domaine C-

terminal est catalytiquement actif. Le site actif de la 3-MST est localisé à l'interface des deux domaines rhodanèses et il est constitué de deux boucles : l'une, appelée boucle catalytique, est composée des 6 résidus dont la cystéine catalytique (Cys237), et la seconde est composée de six résidus (résidus 61 à 66). La cystéine catalytique est sous forme persulfure dans les structures des 3-MST d'*E. coli* (1URH), de *L. major* (1OKG) et humaine en complexe avec du pyruvate (4JGT) alors qu'elle réduite dans la structure de l'enzyme humaine sous forme libre (3OLH).

Dans la structure de la 3-MST d'*E. coli*, la boucle 61-66 adopte deux conformations : une conformation dite fermée, dans laquelle la Cys237 catalytique est protégée du solvant, et une conformation dite ouverte, dans laquelle le site actif est très accessible au solvant. Par contre, dans les autres structures, cette boucle est présente sous une seule conformation proche de celle de la forme ouverte de l'enzyme d'*E. coli* (Figure 19).

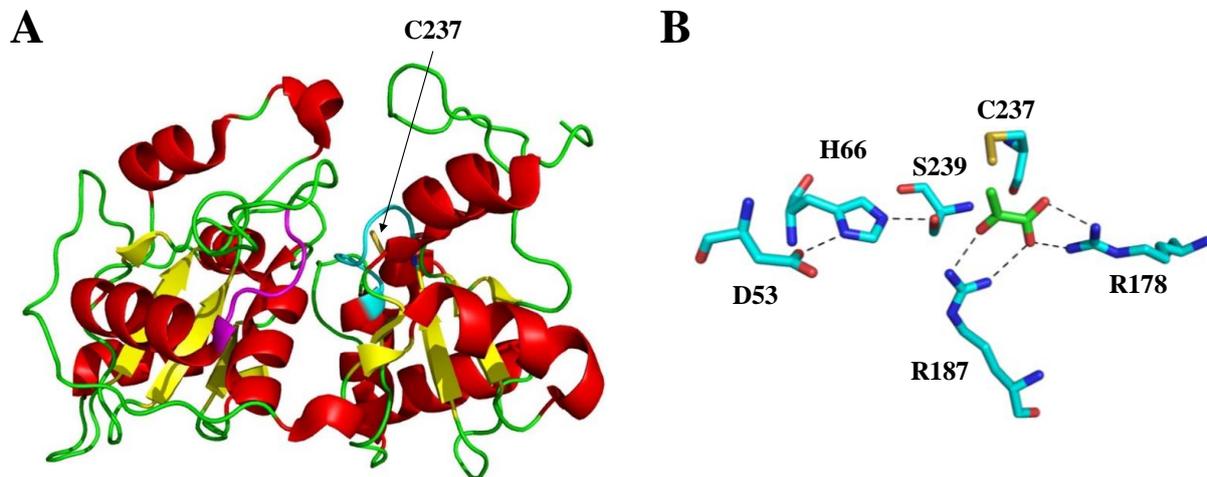


Figure 19. Structure tridimensionnelle de la 3-MST humaine (4JGT).

A : Vue globale de la structure de la 3-MST humaine. La chaîne principale est représentée en mode « rubans et flèches ». Les structures secondaires sont présentées selon le code couleur suivant : les feuillets β sont en jaune, les hélices α en rouge et les boucles en vert. La boucle catalytique conservée est représentée en bleu cyan et la cystéine catalytique est représentée en « boules et bâtons ». La boucle 61-66 est représentée en violet, sa conformation dans la structure de la 3-MST humaine correspond à la conformation ouverte de la 3-MST d'*E. coli*. B : Zoom sur le site actif de l'enzyme. Les résidus potentiellement impliqués dans la catalyse sont représentés en « boules et bâtons » selon le code couleur suivant : les atomes de soufre sont en jaune, les atomes de carbone en bleu cyan, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. Le pyruvate est représenté selon un code couleur différent : les atomes de carbone sont en vert.

2) Structure des TST

Les 3-MST et les TST possèdent une très faible identité de séquence (< 10%). De plus et contrairement aux 3-MST, les TST possèdent une faible identité de séquence entre elles (~40% pour les 3-MST vs. <10% pour les TST), ainsi peu de résidus sont conservés entre les différentes séquences protéiques connues rendant difficile la détermination de séquences

Synthèse bibliographique

signatures communes. Néanmoins la cystéine catalytique est bien évidemment conservée dans toutes les séquences protéiques ce qui permet d'identifier la zone de la boucle catalytique. La séquence signature de cette boucle catalytique est la suivante pour toutes les TST : C-x(2)-[G/H]-x(2) (Figure 20) (Bordo et Bork, 2002).

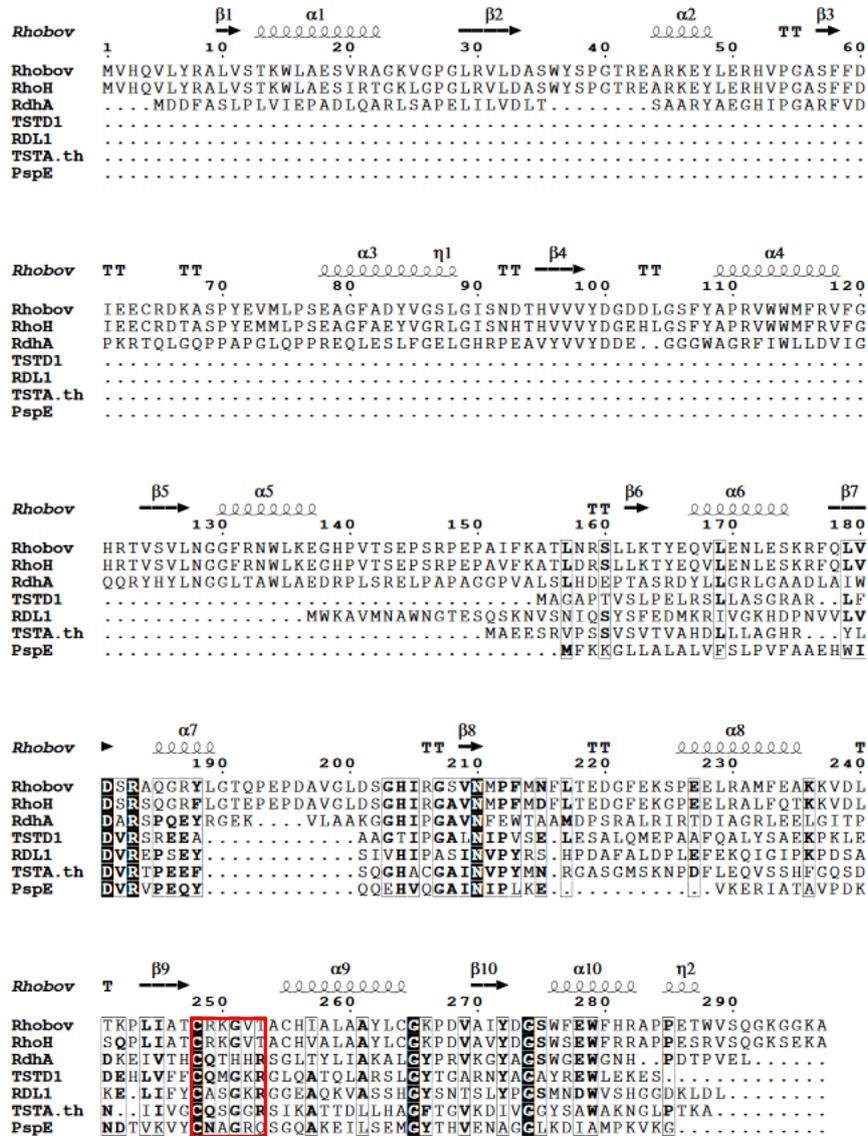


Figure 20. Alignement de séquences protéiques de différentes TST caractérisées au niveau biochimique et/ou structural.

La numérotation utilisée est celle de la Rhodanèse bovine (Rhobov). Les résidus invariants sont indiqués sur fond noir et ceux présentant des propriétés similaires sont encadrés en gris. L'alignement a été réalisé à l'aide des logiciels MultAlin et Esript 3,0 hébergé sur le serveur du Pole Bioinformatique Lyonnais. Les différentes séquences protéiques sont alignées aux structures secondaires de la Rhobov. Les structures secondaires hélice α (spirale), brin β (flèche) et boucle (TT) sont représentées au-dessus de l'alignement de séquences. Les séquences alignées sont celles de la Rhobov, la Rhodanèse humaine (RhoH), la Rhodanèse d'*Azobacter vinelandii* (RdhA), la TSTD1 humaine, la TST de *Saccharomyces cerevisiae* (RDL1), la TST d'*Arabidopsis thaliana* (TSTA.th) et la TST périplasmique d'*E. coli* (PspE). Le cadre rouge désigne la séquence peptidique correspondant à la boucle catalytique.

A ce jour, six structures tridimensionnelles de TST ont été obtenues, dont deux à deux domaines rhodanèse que sont la Rhobov de *Bos taurus* (1RHD) (Ploegman *et al.*, 1978) et la RhdA d'*Azobacter vinelandii* (1E0C) (Bordo *et al.*, 2000), trois à un seul domaine rhodanèse : la PspE d'*E. coli* (2JTQ) (Li *et al.*, 2008), la GlpE d'*E. coli* (1GMX) (Spallarossa *et al.*, 2001) et la TST d'*Arabidopsis thaliana* (1TQ1) (Cornilescu *et al.*, 2006). Et enfin une TST d'*E. coli* à un seul domaine rhodanèse fusionné à un domaine transmembranaire (5HPA pour le domaine rhodanèse et 2MPN pour le domaine intramembranaire) (Ling *et al.*, 2016).

Le site actif est constitué d'une boucle de six résidus contenant la Cys catalytique généralement sous forme persulfure (–SSH). Dans la structure de la GlpE d'*E. coli*, la cystéine catalytique adopte deux conformations : une correspondant au persulfure et l'autre à la forme thiol (Figure 21) (Spallarossa *et al.*, 2001).

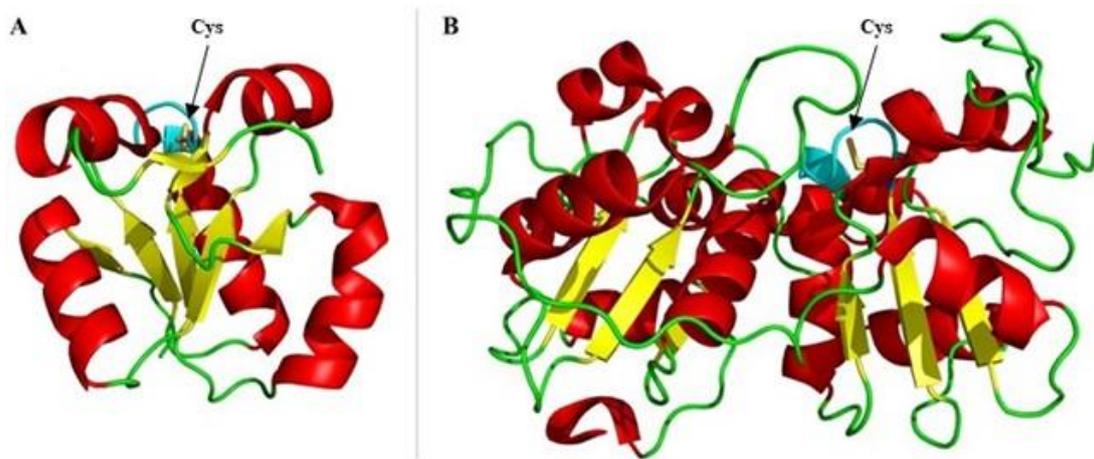


Figure 21. Représentation de la structure d'une TST à un domaine rhodanèse (A) et d'une TST à deux domaines rhodanèse (B).

A : GlpE d'*E. coli* (PDB : 1GMX), cette TST possède un seul domaine rhodanèse.

B : RhdA d'*Azobacter vinelandii* (PDB : 1E0C), cette TST possède deux domaines rhodanèses.

La chaîne principale est représentée en mode « rubans et flèches ». Les structures secondaires sont présentées selon le code couleur suivant : les feuillettes β sont en jaune, les hélices α en rouge et les boucles en vert. La boucle catalytique conservée est représentée en bleu cyan et la cystéine catalytique est représentée en « boules et bâtons ».

III. Mécanisme et spécificités de substrats des 3-MST et TST

1) Mécanisme et spécificités de substrats des 3-MST

a) Mécanisme cinétique

Initialement, un mécanisme de type séquentiel ordonné a été proposé à partir d'études cinétiques réalisées à l'état stationnaire sur la 3-MST de foie bovin (Jarabak et Westley, 1980).

Synthèse bibliographique

Plus récemment, la formation d'un intermédiaire thiosulfoxyde sur la cystéine catalytique a été suggérée, un tel intermédiaire étant compatible avec le mécanisme séquentiel ordonné (Spallarossa *et al.*, 2004) (Figure 22). Ainsi, l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique conduirait à la formation d'un intermédiaire thiosulfoxyde [1]. La réaction de l'accepteur permettrait la formation d'un adduit pyruvate et en présence d'un accepteur à thiol la réaction conduirait à la production d'H₂S [2]. La dernière étape consisterait à l'attaque d'un nucléophile conduisant à la libération du pyruvate et à la régénération de l'enzyme [3] (Spallarossa *et al.*, 2004).

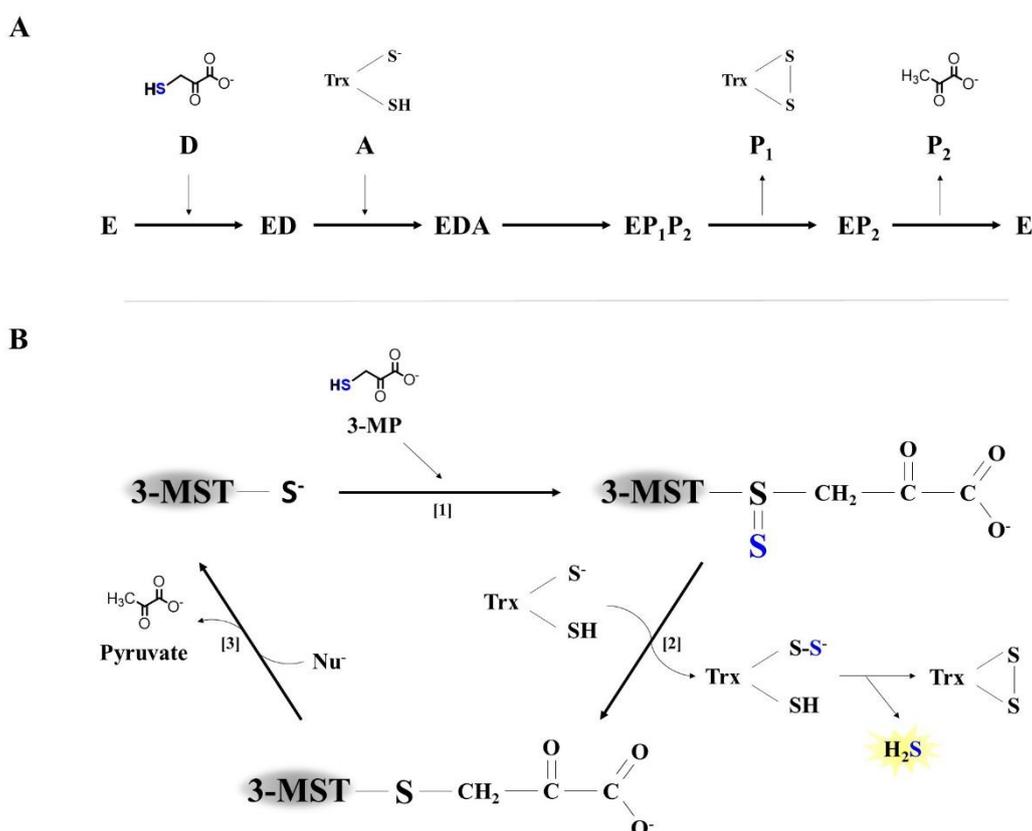


Figure 22. Mécanisme séquentiel ordonné proposé initialement pour les 3-MST.

A : Schématisation selon Cleland du mécanisme séquentiel ordonné.

B : Mécanisme en 3 étapes comprenant la formation d'un intermédiaire thiosulfoxyde et conduisant à la formation d'un adduit pyruvate.

Cependant, une étude antérieure à ma thèse réalisée dans notre équipe a montré que le mécanisme de la 3-MST d'*E. coli* implique la libération de pyruvate (premier produit de la réaction) en absence d'accepteur de soufre, la 3-MST doit donc présenter un mécanisme cinétique de type ping-pong (Master 2, El Sahili, 2012). Ce mécanisme est d'ailleurs globalement admis dans la littérature sur la base de l'analyse des structures tridimensionnelles.

Le mécanisme des 3-MST tel qu'il est admis comporte deux étapes (Figure 23) dans lequel, une attaque nucléophile du groupement thiolate de la cystéine catalytique sur l'atome de soufre du substrat donneur conduit à la formation d'un intermédiaire persulfure sur la cystéine catalytique et à la libération du premier produit [1]. La seconde étape consiste en une attaque nucléophile d'un substrat accepteur sur l'atome de soufre distal de l'intermédiaire persulfure, conduisant à la régénération de la cystéine catalytique et à la libération du second produit [2]. Lorsque l'accepteur de soufre est un composé à groupement thiol, la décomposition enzyme-indépendante de l'accepteur persulfure conduit à la formation d'H₂S.

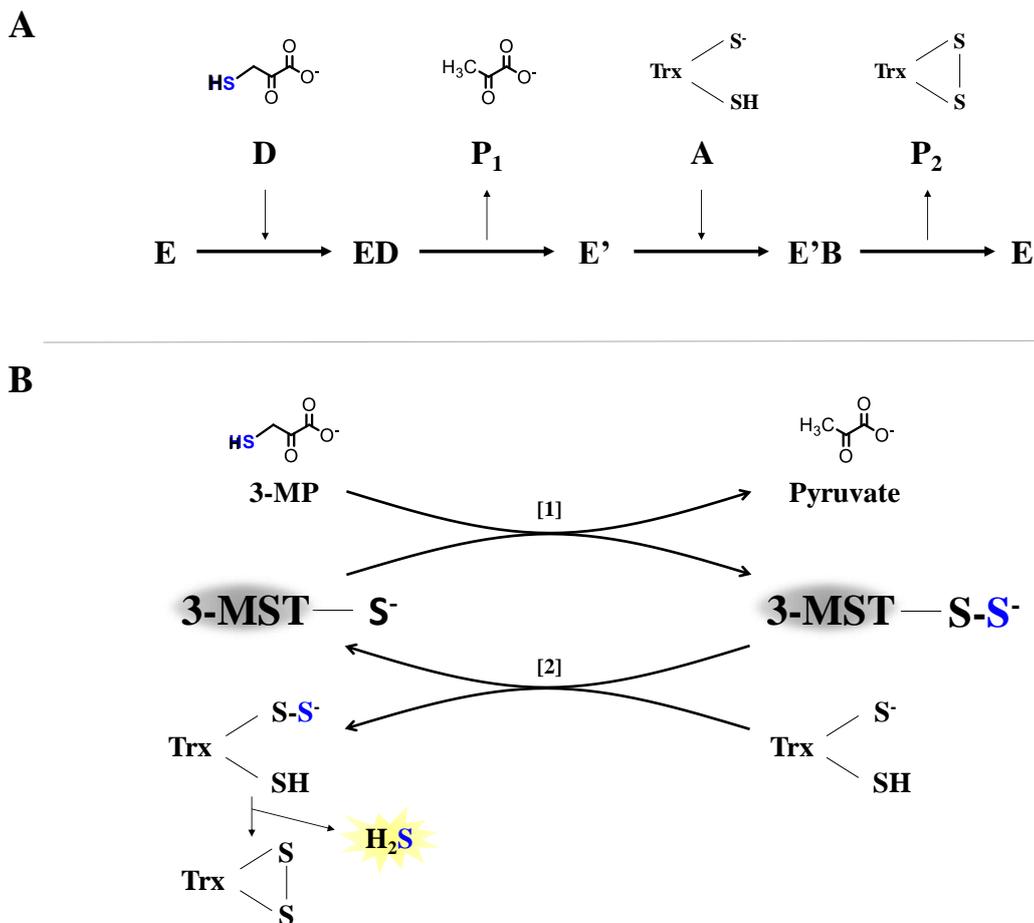


Figure 23. Mécanisme ping-pong admis pour les 3-MST.

A : Schématisation selon Cleland du mécanisme ping-pong.

B : Mécanisme en 2 étapes impliquant la formation d'un intermédiaire persulfure et conduisant à la libération de pyruvate en absence d'accepteur.

b) Spécificités de substrats donneurs et accepteurs de soufre

Les 3-MST peuvent utiliser *in vitro* différents donneurs comme le 3-MP ou le thiosulfate, et différents accepteurs comme le cyanure et des dithiols tels que le DTT, la Trx ou l'acide dihydrolipoïque (DHLLA) (Mikami *et al.*, 2011). La 3-MST utilise préférentiellement le

Synthèse bibliographique

3-MP comme donneur de soufre. En effet, la détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire des 3-MST de *L. major* et de *T. vaginalis* a permis de montrer que la 3-MST présente une spécificité pour le 3-MP par rapport au thiosulfate (rapport $k_{cat}/K_M \times 100$) en présence de Trx comme accepteur (Westrop *et al.*, 2009). Des résultats comparables ont été obtenus pour la 3-MST d'*E. coli* en présence de cyanure comme accepteur (Colnaghi *et al.*, 2001). De plus, des études cinétiques réalisées à l'état stationnaire sur l'enzyme humaine, utilisant le 3-MP comme donneur de soufre et différents accepteurs, mettent en évidence une spécificité pour la Trx : avec un rapport k_{cat}/K_M 52000 fois supérieur à celui obtenu pour d'autres dithiols tels que le DTT et le DHLA (Williams *et al.*, 2003).

c) *Catalyse de transfert de soufre*

Les premiers travaux portant sur l'étude du mécanisme catalytique de la 3-MST de rat ont montré que la Cys237 est le résidu permettant l'attaque nucléophile du substrat. La substitution de résidus conservés du site actif et la caractérisation à l'état stationnaire des propriétés cinétiques des variants obtenus suggèrent que l'Arg178 est impliquée dans la fixation des substrats 3-MP et thiosulfate tandis que la Ser239 ne semble pas avoir de rôle crucial dans la catalyse (Nagahara et Nishino, 1996).

L'étude de la 3-MST d'*E. coli* par un autre groupe suggère que la boucle catalytique conservée dans toutes les 3-MST est importante pour assurer l'activité de transfert de soufre à partir du 3-MP (Colnaghi *et al.*, 2001). Cette étude suggérait que le résidu His66 permet la fixation de la fonction cétone du 3-MP par une liaison H et que le résidu Arg102 est impliqué dans la stabilisation du groupement carboxylate du 3-MP. D'autre part, la résolution récente de la structure de la 3-MST humaine en complexe avec du pyruvate a apporté des informations supplémentaires concernant l'identité des résidus potentiellement impliqués dans la reconnaissance et/ou le positionnement du substrat et dans la catalyse (Yadav *et al.*, 2013). Ainsi, les auteurs proposent l'existence d'une triade catalytique de type protéase à sérine (Ser/His/Asp) qui permettrait l'activation de la cystéine catalytique sous forme thiolate, cette hypothèse avait déjà été proposée auparavant sur la base de l'analyse de la structure tridimensionnelle de la 3-MST de *L. major* (Alphey *et al.*, 2003). La fonction carboxylate de l'Asp53 formerait une liaison H avec l'azote δ de l'His66 celle-ci jouant le rôle de catalyseur base générale permettant la déprotonation du groupement hydroxyle de la Ser239. C'est cette sérine activée qui assurerait ensuite la déprotonation de la cystéine catalytique. De plus, deux résidus Arg (Arg178 et Arg187) semblent être correctement positionnés pour établir des

interactions avec les fonctions carboxylate et carbonyle du pyruvate, et ainsi jouer un rôle dans la reconnaissance et/ou le positionnement du 3-MP (Figure 24).

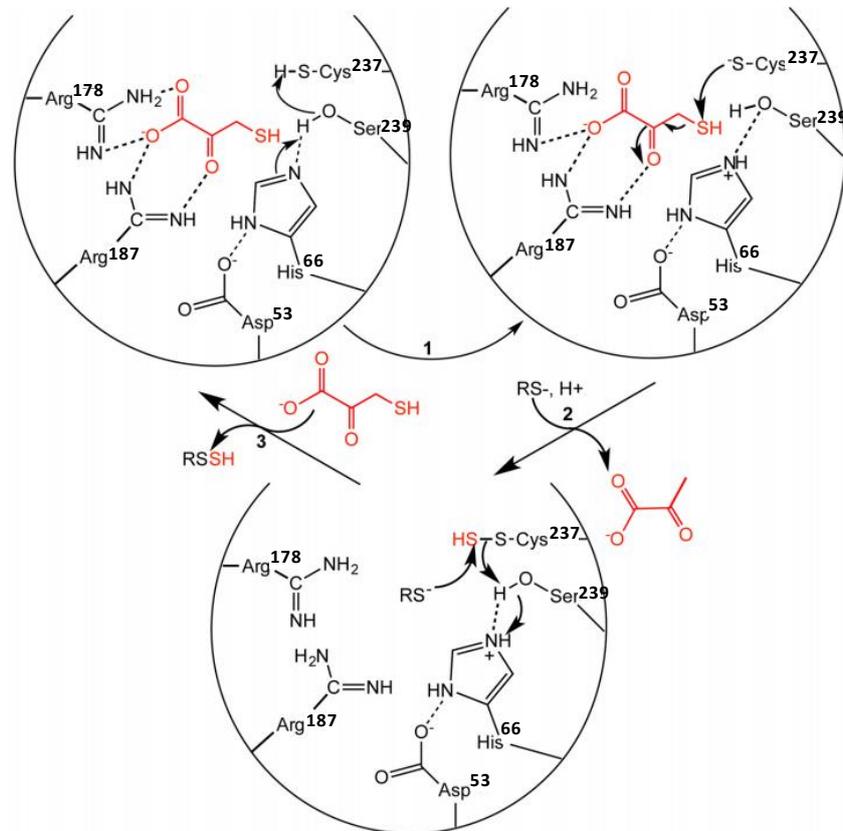


Figure 24. Mécanisme catalytique proposé pour les 3-MST (Yadav et al., 2013).

Les chaînes latérales de la 3-MST humaine apparaissent en noir, le site actif étant modélisé par un rond noir. Le 3-MP, le pyruvate ainsi que le thiol transféré apparaissent en rouge. La nomenclature RS- se réfère à un composé contenant une fonction thiolate et la désignation RSSH correspond à l'accepteur sous forme persulfure après le transfert de soufre.

Enfin, une étude de chimie théorique réalisée sur la structure du complexe entre la 3-MST humaine et le pyruvate, a permis de proposer : (1) que la triade Ser/His/Asp interviendrait dans la déprotonation de la cystéine catalytique et (2) une contribution électrostatique des NH de la chaîne principale de la boucle catalytique dans le transfert de S⁰ plutôt que de SH qui est pourtant thermodynamiquement favorisé en solution (Huang et Yu, 2016).

2) Mécanisme et spécificités de substrats des TST

a) *Mécanisme cinétique*

Les premières études cinétiques, réalisées sur la Rhodanèse de *B. taurus*, ont montré que cette enzyme présente un mécanisme cinétique de type ping-pong, passant par la formation d'un intermédiaire covalent (Green et Westley, 1961 ; Westley et Heyse, 1971).

Synthèse bibliographique

Le mécanisme des TST se composerait de deux étapes (Figure 25) dans lequel, une attaque nucléophile du groupement thiolate de la cystéine catalytique sur l'atome de soufre du substrat donneur conduirait à la formation d'un intermédiaire persulfure sur la cystéine catalytique et à la libération du produit [1]. Ceci a été proposé par le suivi de la radioactivité du ^{35}S initialement présent sur le thiosulfate ($\text{SS}^{35}\text{O}_3^{2-}$) et transféré ensuite sur l'enzyme (Westley et Nakamoto, 1962). Outre cette expérience et l'analyse des structures tridimensionnelles des TST caractérisées, il est à noter qu'il n'existe pas de preuve directe de la formation de cet intermédiaire persulfure sur la cystéine catalytique. La seconde étape consisterait en une attaque nucléophile d'un substrat accepteur sur l'atome de soufre distal de l'intermédiaire persulfure, conduisant à la régénération de la cystéine catalytique et à la libération du second produit [2]. Des expériences plus récentes menées sur les GlpE et PspE d'*E. coli* ou sur des TST d'origine eucaryote (TSTD1 humaine et RDL1 de levure) ont montré que ces TST à un seul domaine rhodanèse présentent un mécanisme et des propriétés cinétiques équivalents à ceux des TST à deux domaines rhodanèse (Ray *et al.*, 2000 ; Melideo *et al.*, 2014 ; Libiad *et al.*, 2014).

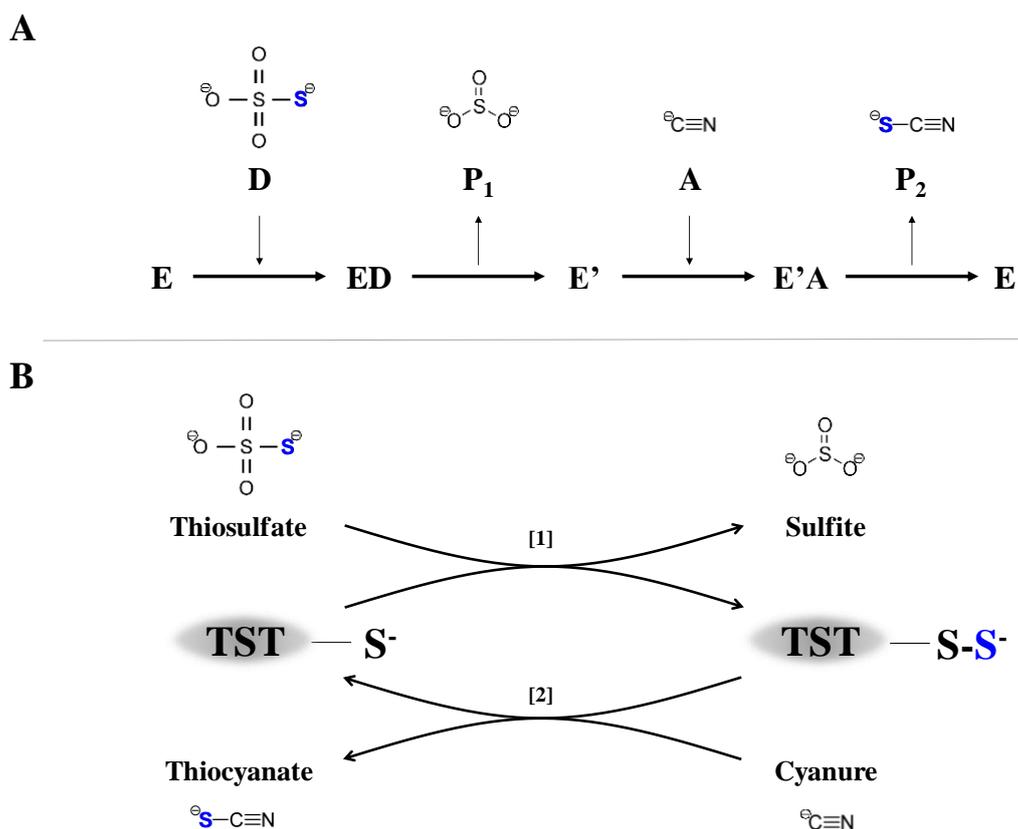


Figure 25. Mécanisme proposé pour les TST.

A : Schématisation selon Cleland du mécanisme ping-pong.

B : Mécanisme en 2 étapes impliquant la formation d'un intermédiaire persulfure et conduisant à la libération de sulfite en absence d'accepteur.

b) Spécificités de substrats donneurs et accepteurs de soufre

Les TST ont été découvertes il y a plus de 70 ans mais leurs spécificités de substrats ne sont pas encore clairement établies et sont encore l'objet de débats dans la littérature. Les différents travaux publiés à ce jour sont contradictoires à cause de la diversité et de la sensibilité relative des différentes techniques utilisées.

Les TST utilisent le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ou les anions thiosulfonates organiques (RSO_2S^{2-}) comme substrat donneur mais elles présentent également une activité avec le 3-MP, qui est décrite pour être de l'ordre de $1/100^{\text{ème}}$ de celle déterminée en présence de thiosulfate (Ray *et al.*, 2000). La Rhodanèse bovine serait également capable d'utiliser la thiocystine comme substrat donneur de soufre, ceci ayant été démontré par marquage au ^{35}S de la thiocystine (Abdolrasulnia et Wood, 1979). Plus récemment, il a été mis en évidence que la Rhodanèse humaine présente une efficacité catalytique mille fois supérieure en présence de glutathion sous forme persulfure (GSSH) par rapport au thiosulfate (Libiad *et al.*, 2014).

Différents substrats accepteurs de l'atome de soufre ont également été identifiés *in vitro* : à titre d'exemple non physiologique, le DTT est un accepteur potentiel des TST (Pecci *et al.*, 1976). Le premier substrat accepteur mis en évidence pour les TST est le cyanure grâce à l'étude de la Rhodanèse bovine puis des TST bactériennes GlpE et PspE. Les TST présentent néanmoins une faible affinité apparente pour le cyanure avec des K_M excédant le millimolaire (Westley, 1981 ; Ray *et al.*, 2000 ; Adams *et al.*, 2002b). L'utilisation d'un système couplé Trx réductase/NADPH a permis de montrer que parmi les dithiols potentiels, la Trx réduite serait le meilleur accepteur pour la Rhodanèse bovine avec des constantes d'affinité apparentes K_M de l'ordre du micromolaire contre des K_M proches du millimolaire pour les autres dithiols tels que le DTT et le DHLA. Par contre, l'utilisation de tels substrats par la Rhodanèse bovine conduirait à la production de soufre labile. De plus, il a été montré que cette TST n'était pas capable d'utiliser le GSH ou la L-cystéine comme accepteur de soufre (Nandi et Westley, 1998). Enfin, des travaux plus récents montrent que le sulfite est un bon substrat accepteur de soufre pour la Rhodanèse ce qui conduit à la formation de thiosulfate, le K_M déterminé pour le sulfite étant de l'ordre de la centaine de micromolaires. Dans cette même publication, le GSH et la L-cystéine ont également été utilisés comme substrats accepteurs de la réaction mais les valeurs de K_M excèdent très largement le millimolaire ce qui exclut la possibilité qu'ils soient des accepteurs physiologiques pour cette enzyme (Libiad *et al.*, 2014).

Synthèse bibliographique

c) Catalyse de transfert de soufre

Hormis la Cys essentielle, il n'existe à ce jour aucune information concernant les résidus impliqués dans le mécanisme des TST en particulier dans la catalyse des transferts de soufre.

IV. Rôles physiologiques des thioltransférases

1) Gènes chez l'Homme

Dans le génome humain, seul un gène a été annoté comme codant une 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, le loci de ce gène se situe sur le chromosome 22. Des expériences d'immunofluorescence réalisées sur des cellules immortalisées humaines HEK295 ont montré que la 3- MST humaine se situe dans le cytoplasme et la mitochondrie (Fräsdorf *et al.*, 2014). Cette double localisation subcellulaire étant due à la présence de deux isoformes de l'enzyme, l'une comportant l'étiquette d'adressage à la mitochondrie en N-terminal et l'autre possédant une séquence peptidique additionnelle en N-terminal qui masque la séquence d'adressage. La présence ou non de ce fragment peptidique est dictée par un phénomène d'épissage alternatif conduisant au maintien ou pas de la séquence nucléotidique codant ce fragment additionnel. Il est à noter que ces deux isoformes possèdent des propriétés cinétiques et physicochimiques identiques.

Cinq gènes ont été annotés comme codant des thiosulfate sulfurtransférases dans le génome humain. Il y a les gènes codant la Rhodanèse, la TSTD1, la TSTD2, la TSTD3 et LOC100130574 dont les loci se situent respectivement sur les chromosomes 22, 1, 9, 6 et 5. Parmi les enzymes codées par ces différents gènes, seules la Rhodanèse et la TSTD1 ont été caractérisées au niveau biochimique. Notons que la Rhodanèse humaine est décrite pour être présente dans le cytosol sous forme non structurée et au niveau mitochondrial sous forme structurée tandis qu'une localisation cytoplasmique a été mise en évidence expérimentalement pour la TSTD1. De plus, il est suggéré que la TSTD1 soit présente dans la mitochondrie grâce à l'étude de sa séquence protéique avec des logiciels de prédiction de localisation subcellulaire.

2) Rôle commun de détoxication du cyanure

Un rôle commun aux 3-MST et TST de détoxication du cyanure est proposé depuis de nombreuses années. Or le cyanure est un poison métabolique qui inhibe la production d'ATP, ainsi une exposition à une concentration élevée en cyanure provoque des effets sévères. Une exposition prolongée conduit à une perte de connaissance et à des défaillances cardiaques et respiratoires conduisant à la mort de l'individu en quelques minutes.

Il est connu depuis le début du XIXe siècle que des doses importantes de cyanure ingérées ou inhalées sont détoxifiées dans l'organisme par réaction avec le soufre. Les TST sont les premières thioltransférases à domaine rhodanèse mises en évidence, elles ont été décrites pour la première fois en 1933 par Lang. Il leur donna le nom de Rhodanèse en référence à la terminologie dérivée du mot allemand « rhodanide » qui se rapporte à l'un des produits possibles de la réaction qui est le thiocyanate (Clemedson *et al.*, 1954).

Des études biochimiques réalisées *in vitro* ont permis de montrer que les thioltransférases sont capable de transférer un atome de soufre sur le cyanure conduisant à la formation d'un produit moins toxique appelé thiocyanate (Leininger et Westley, 1968). D'ailleurs cette hypothèse de détoxication est supportée par le fait que ces enzymes sont surproduites suite à une exposition au cyanure (Sylvester et Sander, 1990). La concentration en Rhodanèse est élevée dans les hépatocytes, dans les cellules épithéliales entourant les bronchioles (voie d'entrée importante pour le cyanure gazeux) et au niveau des cellules du tube proximal des reins (zone d'élimination du thiocyanate). De plus elle est fortement exprimée dans les cellules épithéliales de l'estomac des ruminants, où le cyanure est libéré lors de l'ingestion de plantes cyanogéniques. A ce niveau, l'activité de la Rhodanèse est très supérieure à celle mesurée dans le foie ce qui représente un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de la Rhodanèse dans la détoxication du cyanure (Aminlari et Gilanpour, 1991). Enfin la Rhodanèse a été détectée dans le cerveau de souris au niveau d'une aire produisant le cyanure pour une action suggérée de neuromodulateur (Borowitz *et al.*, 1997).

Un mécanisme moléculaire de détoxication du cyanure par une TST bactérienne membranaire appelée YgaP a été proposé. Ce mécanisme repose sur une étude structurale par RMN couplée à de la modélisation. YgaP est composée de deux domaines : un domaine cytosolique de type rhodanèse à activité TST, et un domaine membranaire responsable de la dimérisation. Ainsi, en présence de thiosulfate, la formation de l'intermédiaire persulfure sur le

Synthèse bibliographique

domaine TST induirait un changement conformationnel permettant la dimérisation de YgaP. A ce stade, le cyanure transformé en thiocyanate serait acheminé vers la membrane pour être éliminé par un pore membranaire (Figure 26) (Ling *et al.*, 2016).

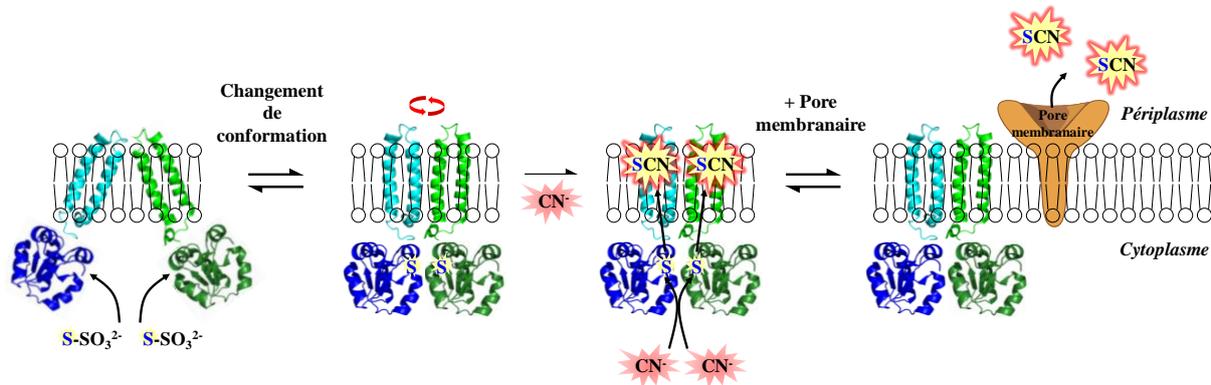


Figure 26. Mécanisme d'action hypothétique de la protéine membranaire bactérienne YgaP dans la détoxification du cyanure (Adapté de Ling *et al.*, 2016).

La protéine YgaP d'*E. coli* est homodimérique, chaque monomère contenant un domaine rhodanèse et un domaine transmembranaire. Un changement de conformation est initié par la formation d'un intermédiaire persulfure sur la cystéine catalytique de chacun des domaines rhodanèses. Le cyanure joue le rôle d'accepteur de soufre pour le domaine rhodanèse ce qui conduit à la formation de deux moles de thiocyanate. L'interaction de YgaP avec un pore membranaire non identifié permettrait l'excrétion du thiocyanate dans le périplasma.

Plus récemment, il a été proposé que la 3-MST puisse assurer un premier niveau de protection lors de l'entrée du cyanure dans le cytoplasme et également un deuxième niveau de protection au niveau de la mitochondrie empêchant ainsi une inhibition létale de l'activité de la cytochrome c oxydase (Nagahara *et al.*, 2003).

De ce rôle commun de détoxification du cyanure a découlé l'élaboration de traitements d'urgences contre une intoxication au cyanure. Historiquement, cela avait été proposé pour les TST *via* l'utilisation du trisulfure de diméthyle (DMTS), un donneur de soufre pour la Rhodanèse humaine. La transformation du cyanure en thiocyanate par la Rhodanèse est plus efficace d'un facteur 40 en présence de DMTS par rapport au thiosulfate (Rockwood *et al.*, 2016). D'autre part, dans le cadre d'un programme de recherche en collaboration avec l'armée américaine, une équipe a mis au point un antidote à action rapide pouvant être administré sur des temps courts. Les chercheurs ont développé une prodrogue du 3-MP appelée sulfanegène, un antidote potentiel contre l'empoisonnement au cyanure. Cet antidote repose sur l'activité de la 3-MST qui a été montrée être plus importante que celle de la Rhodanèse en présence de cyanure. En outre le sulfanegène (dimère cyclique de la forme hémithioacétal du 3-MP) est plus stable que le 3-MP, il peut être administré rapidement par injection intramusculaire, et son

efficacité a été prouvée sur plusieurs modèles animaux (Patterson *et al.*, 2013 ; Patterson *et al.*, 2016).

3) Rôles proposés pour les 3-MST

Un rôle de la 3-MST a été clairement montré dans la production d'H₂S principalement au niveau du cerveau, des reins et du foie. Comme énoncé dans le paragraphe II-2) du chapitre I de l'introduction, la 3-MST est la seule enzyme permettant la production d'H₂S au niveau de la mitochondrie. Cette production d'H₂S est permise par l'utilisation du 3-MP comme donneur de soufre et l'action d'un réducteur cellulaire tel que la Trx permet ensuite la formation d'H₂S. Des études réalisées sur des cellules hépatomes de souris et des mitochondries isolées de foie ont permis de montrer que l'H₂S produit par la 3-MST en présence d'un excès de 3-MP entraîne la stimulation de la bioénergétique mitochondriale (Módis *et al.*, 2013a). En plus de ce rôle propre à la 3-MST, d'autres rôles liés à la synthèse d'H₂S peuvent être attribués à cette enzyme à l'instar des rôles développés dans le paragraphe III du chapitre I de l'introduction.

D'autre part, la 3-MST interviendrait dans la thiolation des ARNt et la biosynthèse des protéines à molybdène en tant que donneur de soufre. La thiolation de l'uridine en position 2 est connue pour assurer l'étiquetage correct du code génétique et la stabilisation de l'ARN tandis que le molybdène est indispensable à l'activité de nombreuses enzymes. Des expériences de résonance plasmonique de surface sur les protéines humaines couplées à des tests de complémentation avec la protéine split (split-EGFP) réalisées sur les cellules humaines HEK295 et les cellules HeLa ont permis de montrer que : (1) l'isoforme 1 de la 3-MST présente dans le cytosol est capable d'interagir avec les protéines NFS1 et MOCS ; (2) l'isoforme 2 présente dans les deux compartiments interagit avec MOCS3 au niveau cytoplasmique et NFS1 au niveau mitochondrial, avec une affinité relativement forte (constantes de dissociation K_D mesurées de l'ordre du micromolaire).

Par conséquent, ces résultats suggèrent des rôles différents de la 3-MST en fonction de sa localisation subcellulaire. Au niveau mitochondrial, l'interaction entre la 3-MST et la cystéine désulfurase NFS1 permettrait la thiolation des ARNt mitochondriaux. Alors qu'au niveau cytosolique, l'interaction entre la 3-MST et MOCS3 permettrait la biosynthèse des protéines à molybdène (Figure 27) (Fräsdorf *et al.*, 2014).

Synthèse bibliographique

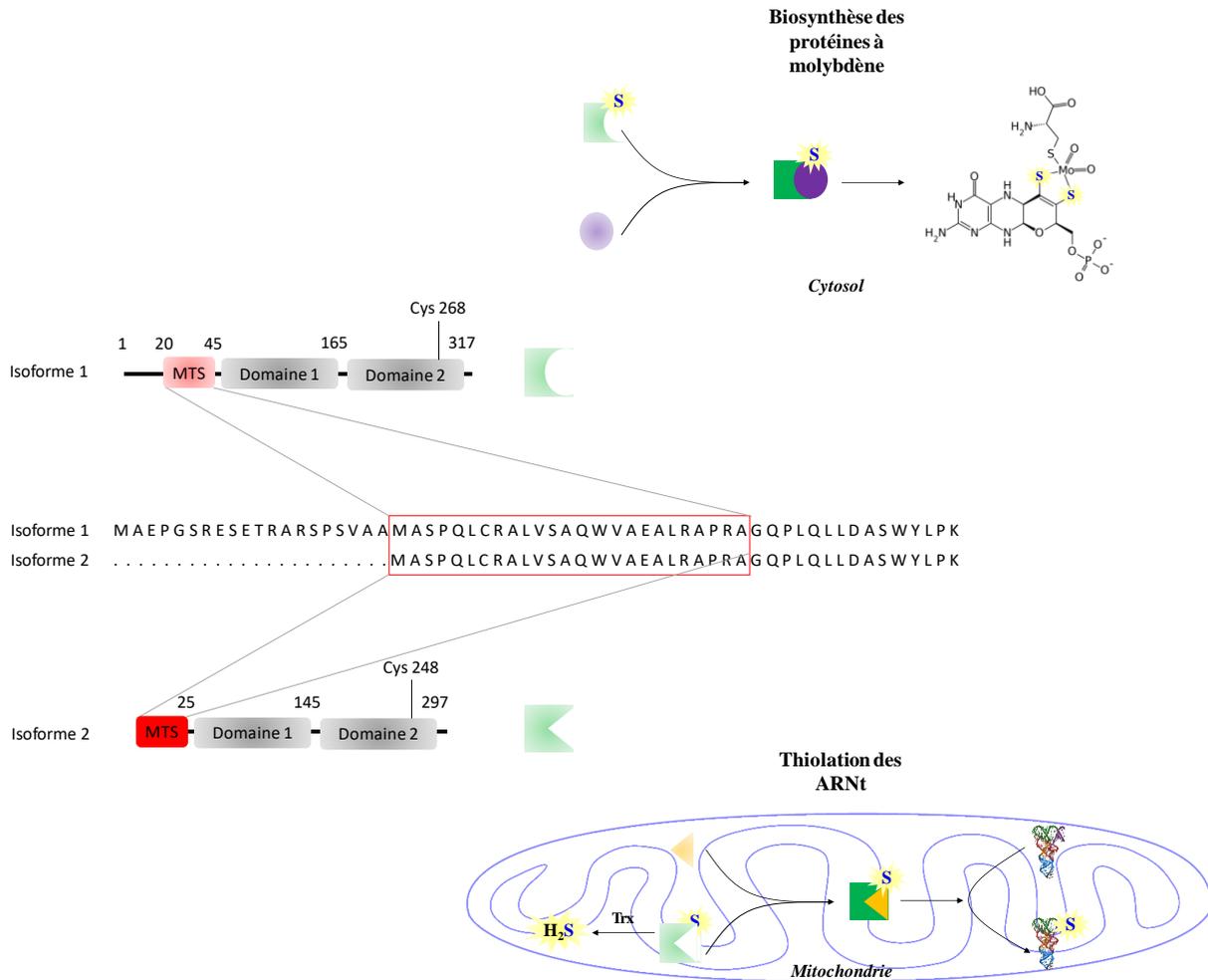


Figure 27. Mécanisme de compartimentation subcellulaire de la 3-MST humaine et les deux rôles proposés en fonction de la localisation de l'enzyme (Adapté de Fräsdorf et al., 2014).

L'épissage alternatif du gène codant la 3-MST conduit après la traduction à deux isoformes de l'enzyme. L'isoforme 1 contient une séquence peptidique de 20 résidus qui masque la séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) par conséquent cette isoforme 1 est présente uniquement au niveau cytosolique. Par contre, l'isoforme 2 ne contient pas cette séquence de masquage, la séquence d'adressage est par conséquent exposée ce qui permet son import mitochondrial.

Cette double localisation subcellulaire ainsi que la différence de spécificité d'interaction entre les deux isoformes et les protéines MOCS3 et NFS1 conduit à l'existence de deux rôles physiologiques potentiels distincts. L'isoforme 2 mitochondriale de la 3-MST interagit avec NFS1 (triangle jaune) permettant *a priori* la thiolation des ARnt mitochondriaux. Alors que l'isoforme 1 présente au niveau cytosolique interagit avec MOCS3 (rond violet) ce qui permettrait la biosynthèse des protéines à cofacteurs à molybdène.

La 3-MST est par ailleurs impliquée, avec la CAT, dans le catabolisme de la cystéine. La dégradation de la cystéine permettrait d'éviter son accumulation, qui pourrait avoir comme conséquence la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) et donc la formation de radicaux libres toxiques *via* la réaction de Fenton (Park et Imlay, 2003). Or les radicaux libres toxiques tel que le radical hydroxyle attaquent le ribose ou la base azotée des acides nucléiques conduisant à la fragmentation des riboses, à la scission des brins ou à la formation d'adduits de bases azotés (Figure 28) (Stipanuk *et al.*, 2006).

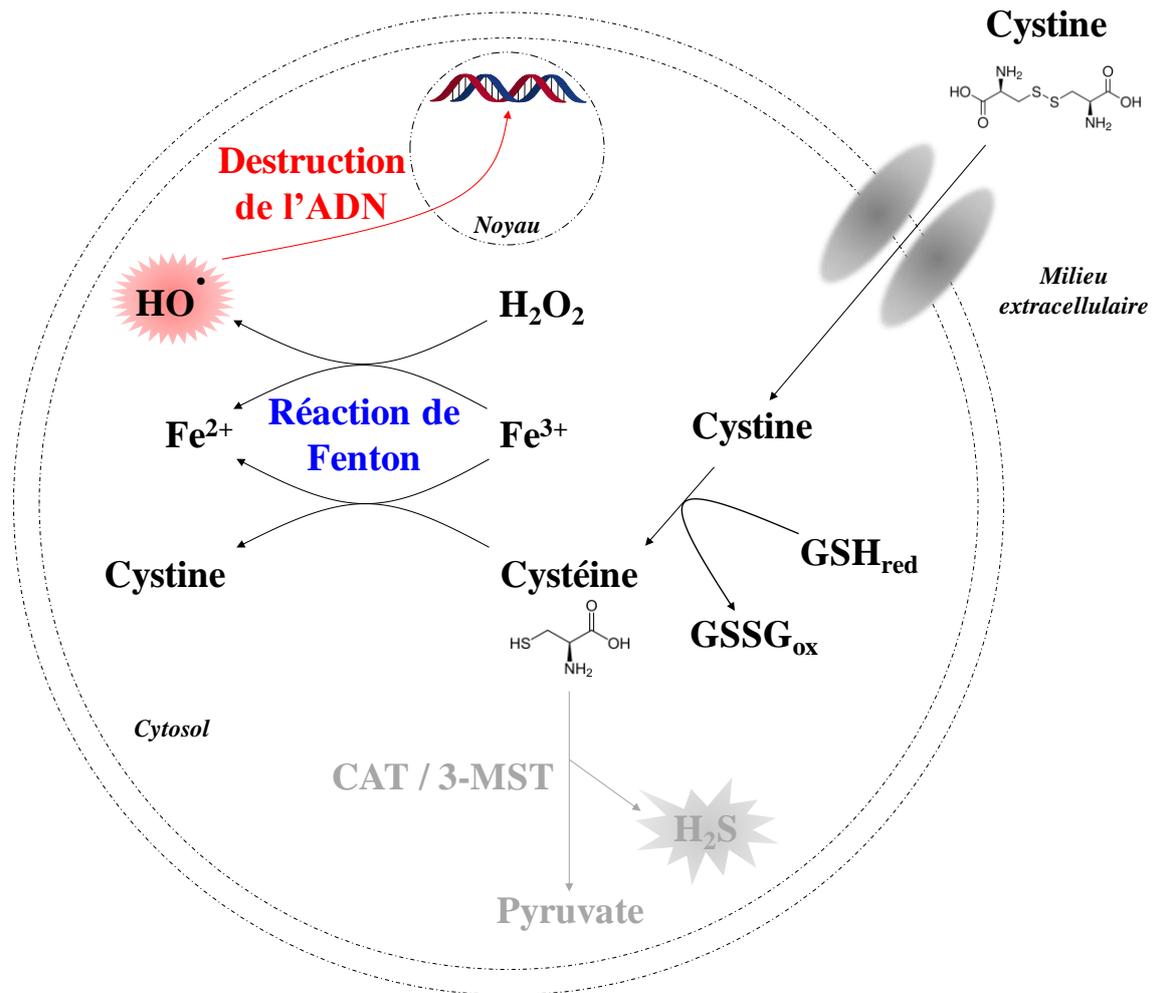


Figure 28. Mécanisme simplifié conduisant à la réaction de Fenton par accumulation de la cystéine dans la cellule.

La cystine dans le cytoplasme est rapidement réduite en cystéine, celle-ci étant toxique à forte concentration. Plusieurs systèmes utilisent la cystéine empêchant son accumulation, c'est le cas du système CAT / 3-MST qui la transforme en pyruvate et H₂S. Par contre une accumulation de la cystéine conduit à la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ qui en présence d'H₂O₂ sera oxydée en Fe³⁺ pour produire du radical hydroxyle (HO·). Cette espèce est à l'origine de dégâts importants au niveau de la double hélice d'ADN.

La 3-MST jouerait ainsi des rôles variés dans la cellule et l'absence de cette enzyme est à l'origine d'une anomalie biochimique héréditaire autosomique récessive rare, appelée 3-mercaptopylactate cystéine disulfurée (MCDU). Cette pathologie a été caractérisée pour la première fois en 1968 lors d'un programme de dépistage de l'homocystinurie dans une population mentalement retardée du Massachusetts. La MCDU résulte probablement d'une surproduction de 3-mercaptopylactate, qui en présence de cystéine, est converti en un produit disulfure mixte. Deux voies sont en compétition pour l'utilisation du 3-MP : (1) le 3-mercaptopylactate peut être réduit en 3-mercaptopylactate par l'action de la lactate déshydrogénase, (2) la 3-MST peut catalyser la transformation du 3-MP majoritairement en thiocyanate ou thiosulfate de manière directe ou indirecte. Une déficience en activité 3-MST

Synthèse bibliographique

pourrait donc expliquer une formation accrue de 3-mercaptopyrivate suite à une accumulation de 3-mercaptopyrivate (Hannestad *et al.*, 1981).

Peu de cas pathologiques sont décrits dans la littérature notamment du fait de la difficulté à établir un diagnostic. Cette maladie est mise en évidence par une réponse positive au test cyanure-nitroprussiate attestant de la présence d'un excès de cyanure dans les urines provenant *a priori* de la diminution de sa transformation en thiocyanate (Crawhall, 1985). Néanmoins la réponse positive à ce test peut également être due à une cystinurie ou une homocystinurie. Ces dernières possibilités peuvent être écartées sur la base de la chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse permettant de mettre en évidence la présence du produit disulfure mixte évoqué précédemment dans un cas pathologique de MCDU.

La plupart des cas de MCDU sont associées à un retard mental mais la pathogénèse reste néanmoins inconnue. Pour éclaircir le mécanisme physiopathologique de cette maladie, des chercheurs ont généré des souris knockout (KO) du gène *Mpst* en utilisant des cellules souches embryonnaires. Les souris MST-KO ont montré des comportements d'anxiété accrue avec une augmentation du niveau de sérotonine dans le cortex préfrontal sans modification de la morphologie du cerveau. En définitive, les chercheurs ont conclu que ce comportement caractéristique était dû à une diminution de la production d' H_2S et de ses espèces dérivées telles que les polysulfures ainsi qu'à une diminution de la défense antioxydante dans l'organisme (Nagahara *et al.*, 2013).

4) Rôles proposés pour les TST

Comme énoncé dans le paragraphe II-3) du chapitre I de l'introduction, il est admis que les TST interviennent dans le catabolisme d' H_2S selon un mécanisme SOU-dépendant, ce complexe SOU sera l'objet du chapitre III de l'introduction.

Il a été proposé que la Rhodanèse soit impliquée dans la production de soufre labile pour la synthèse des protéines à centre Fe/S à partir du thiosulfate. En effet les études réalisées *in vitro* ont montré que l'incubation de la forme apo d'une ferrédoxine en présence de Na_2S , $Fe(NO_3)_3$ et DTT conduit à une augmentation de l'absorbance à 422 nm (signature spécifique aux centres Fer/S), la ferrédoxine obtenue étant parfaitement active. De plus, la substitution du Na_2S par le thiosulfate et la Rhodanèse conduit au même résultat avec une constante de vitesse dépendante de la concentration en enzyme (Agrò *et al.*, 1971).

Un rôle potentiel des TST dans le métabolisme du sélénium a été également proposé sur la base d'études réalisées *in vitro*. Plus précisément, les TST interviendraient dans la synthèse du sélénophosphate (SePO_3^{3-}) permettant la production de sélénocystéine essentielle à la fabrication des sélénoenzymes (Ogasawara *et al.*, 2001). En effet, suite à sa réaction avec du sélénosulfate (SeSO_3^{2-}), la Rhodanèse bovine est capable de fixer un atome de sélénium selon un ratio molaire 1/1 ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire persélénium stable sur la cystéine catalytique (Cys-S-Se⁻) (Cannella *et al.*, 1975).

De plus, des données mixtes cellulaires et moléculaires ont clairement permis de montrer que la Rhodanèse humaine est impliquée dans l'import mitochondrial de l'ARN 5S, celui-ci étant un constituant essentiel de la grande sous-unité ribosomale 60S. Cet ARN 5S est indispensable à la formation de la machinerie ribosomale qui permet la biosynthèse des protéines codées par l'ADN mitochondrial. Le mécanisme d'import de cet ARN ribosomique au sein des mitochondries implique au moins deux précurseurs de protéines mitochondriales que sont la préMRP L-18 et l'enzyme Rhodanèse. La préMRP L-18 et la Rhodanèse naissante interagissent respectivement avec les domaines α et γ de l'ARN 5S, alors que le domaine β peut être substitué et/ou remplacé sans diminution de la capacité d'import mitochondrial (Smirnov *et al.*, 2008). La fixation de la Rhodanèse au niveau du domaine γ de l'ARN 5S pour lequel elle possède une forte affinité, nécessite au préalable un changement conformationnel de cet ARN 5S induit par la protéine MRP L-18 (Smirnov *et al.*, 2010 ; Smirnov *et al.*, 2011). La Rhodanèse ne possède pas de séquences d'adressage à la mitochondrie dans sa séquence protéique, ainsi l'interaction de cette protéine sous sa forme non structurée avec l'ARN 5S lui procure la capacité de translocation dans la mitochondrie (Figure 29).

Synthèse bibliographique

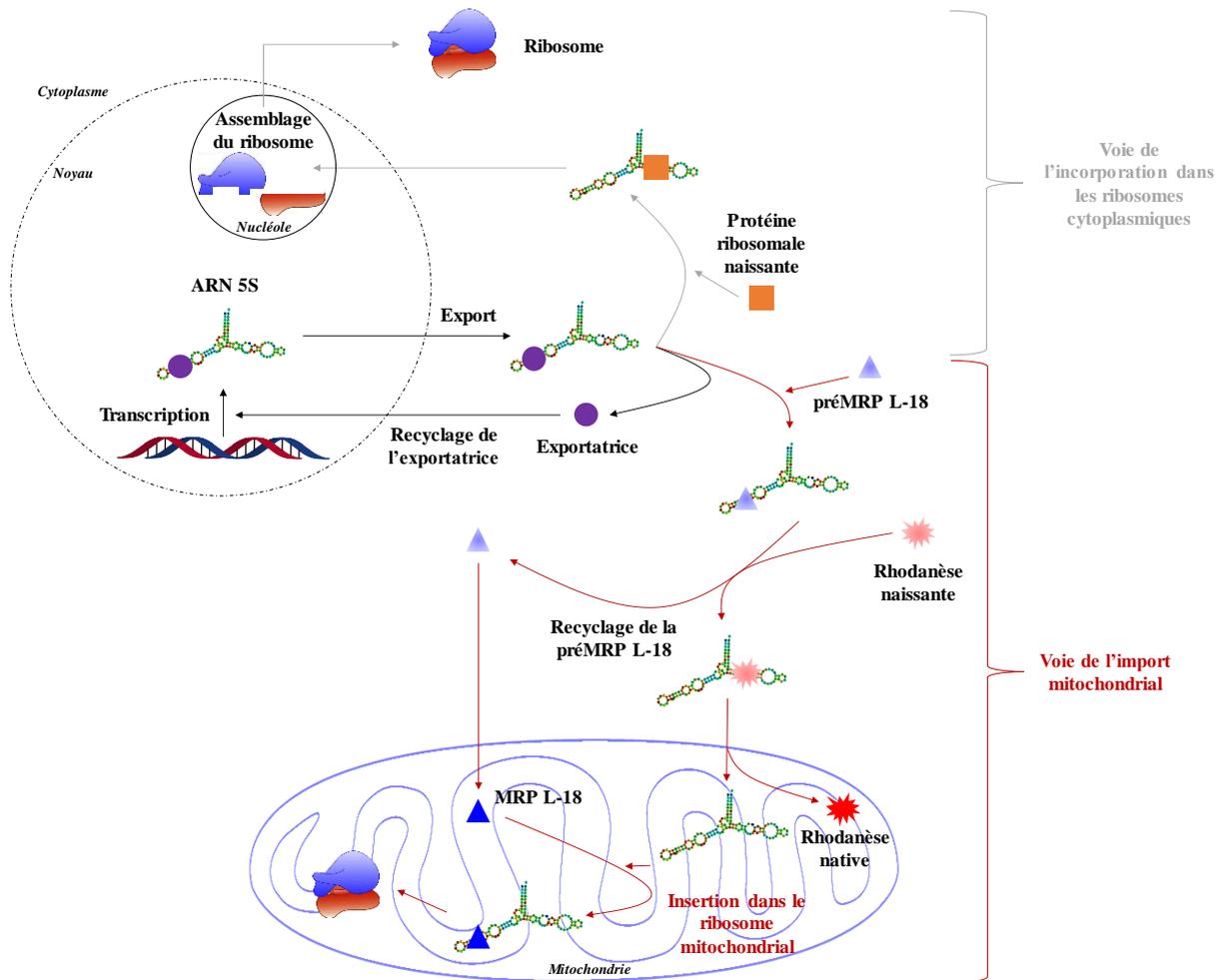


Figure 29. Mécanisme proposé du trafic intracellulaire de l'ARN 5S (Adapté de Smirnov et al., 2011).

L'ARN 5S, une fois transcrit, est exporté dans le cytoplasme grâce à une protéine exportatrice. Deux voies sont ensuite possibles : (1) La première concerne l'import de l'ARN 5S au niveau mitochondrial. La pré-MRP L-18 se fixe au domaine α de l'ARN 5S ce qui conduit à un changement de sa conformation. La Rhodanèse peut ainsi se fixer sur le domaine γ de l'ARN 5S et il y a co-translocation des deux partenaires du complexe au niveau mitochondrial. La Rhodanèse se dissocie de l'ARN 5S et se replie pour adopter sa conformation native tandis que l'ARN 5S s'insère dans le ribosome après fixation de la protéine native MRP L-18. La protéine MRP L-18 se dissocie au moment de l'incorporation de l'ARN 5S dans le ribosome. (2) La deuxième voie conduit à l'incorporation de l'ARN 5S dans le ribosome au niveau du nucléole et il s'ensuit l'export de la machinerie ribosomale au niveau cytoplasmique.

Une étude sur modèle animal a permis de proposer un rôle de la Rhodanèse dans la régulation de la masse grasse. Chez la souris, une élévation de l'expression du gène *Tst* dans le tissu adipeux est corrélée à des indices de santé métabolique. La surexpression transgénique du gène *Tst* dans les adipocytes protège les souris contre l'obésité induite par le régime alimentaire et le diabète insulino-résistant. Par contre, les souris déficientes en Rhodanèse présentent un diabète nettement exacerbé, alors que l'activation pharmacologique de la Rhodanèse diminue le diabète dans un modèle murin. Le mécanisme expliquant cet effet passerait par une augmentation sélective des fonctions mitochondriales combinée à la dégradation des espèces

oxygénées réactives et de l'H₂S. Chez l'Homme, l'expression du messenger Rhodanèse dans le tissu adipeux est corrélée positivement avec la sensibilité à l'insuline et négativement avec la masse grasse. Ainsi, l'identification génétique du gène *TST* comme régulateur bénéfique de la fonction mitochondriale des adipocytes pourrait avoir une signification thérapeutique pour les personnes atteintes de diabète de type 2 (Morton *et al.*, 2016).

Il existe ainsi beaucoup d'exemples de fonctions physiologiques proposées ou démontrées pour les TST. Néanmoins dans certains cas la déficience ou la présence en trop grande quantité de cette enzyme est associée à des processus physiopathologiques. A titre d'exemple, une équipe a mis en évidence que le gène *KAT* codant l'enzyme TSTD1 est surexprimé dans de nombreuses lignées cancéreuses humaines. Cette découverte a conduit les chercheurs à proposer un rôle de ce gène dans la genèse des tumeurs, et donc de la TSTD1 dans ce processus (Wenzel *et al.*, 2003).

Enfin, une déficience en activité Rhodanèse est associée à la maladie de Leber, c'est une pathologie rare héréditaire provoquant une atrophie de l'œil (Whitehouse *et al.*, 1989). L'étude de biopsies de foie de patients a permis de montrer que l'activité de cette enzyme diminue lors de l'établissement de cette maladie. La perfusion de ces patients avec du thiosulfate ne provoque pas d'augmentation de la concentration de thiocyanate dans les urines. En comparaison, la même perfusion effectuée sur des personnes ne présentant pas la pathologie provoque l'augmentation de l'excrétion urinaire de thiocyanate, ce produit étant présent très faiblement avant la perfusion (Cagianut *et al.*, 1984). Ceci suggère que la détoxication du cyanure est sous-optimale chez les patients atteints de la maladie de Leber *a priori* du fait de la diminution de l'activité de la Rhodanèse.

Chapitre III. Le complexe SOU

L'oxydation d'H₂S serait réalisée par le complexe SOU, un complexe multienzymatique composé de trois protéines : la SQOR, ETHE1 et une TST humaine qui peut être la Rhodanèse ou la TSTD1 selon les hypothèses respectives du Dr. Banerjee et du Dr. Jorns (Libiad *et al.*, 2014 ; Melideo *et al.*, 2014). La première enzyme potentiellement impliquée est une flavoprotéine ancrée à la membrane mitochondriale appelée SQOR, et elle catalyse l'oxydation d'H₂S conduisant à la formation d'une forme persulfure de cette enzyme. Les électrons ainsi libérés sont ensuite transférés au coenzyme Q (Kabil et Banerjee, 2010a). Le soufre de l'intermédiaire persulfure est transféré sur un accepteur dont la nature fait encore débat dans la littérature. L'étude de la spécificité de substrats de la SQOR humaine en solution a montré que le sulfite est le substrat préférentiel de cette enzyme et pas le GSH (Augustyn *et al.*, 2017 ; Jackson *et al.*, 2012). A l'inverse, une étude réalisée sur la SQOR intégrée dans des nanodisques lipidiques, afin de reproduire le contexte membranaire, suggère que le GSH est le substrat physiologique de la SQOR (Landry *et al.*, 2017).

I. Les deux hypothèses de fonctionnement du complexe SOU

1) Hypothèse du Dr. Jorns

Le groupe du Dr. Jorns propose que le substrat accepteur préférentiel de la SQOR soit le sulfite ce qui conduirait à la formation de thiosulfate (Jackson *et al.*, 2012 ; Augustyn *et al.*, 2017). En effet, la détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire de la TSTD1 en présence et en absence d'ETHE1 suggère que la TSTD1 assure le lien entre l'activité de la SQOR et celle d'ETHE1. Par contre, deux réactions sont proposées selon la concentration intracellulaire en GSH dans la mitochondrie (Figure 30). A faible concentration en GSH (1a), le thiosulfate serait ensuite utilisé comme donneur de soufre par la TSTD1 ce qui conduirait à la formation de GSSH. Ce dernier serait pris en charge par ETHE1 conduisant à la formation de sulfite. Par contre, à forte concentration en GSH (1b), le thiosulfate produit précédemment par la SQOR serait pris en charge par la TSTD1 mais cela conduirait à la formation d'H₂S et de sulfite. Cette voie constituant un cycle futile, ne permettrait pas l'élimination d'H₂S lorsque la concentration en GSH est élevée (Melideo *et al.*, 2014). Ce mécanisme conduirait à la formation

de sulfite qui serait ensuite transformé en sulfate par la sulfite oxydase, cette enzyme n'appartenant pas au complexe SOU tel qu'il est défini.

2) Hypothèse du Dr. Banerjee

Selon l'hypothèse du Dr. Banerjee (Figure 30, (2)), le substrat accepteur de soufre de la SQOR est le GSH conduisant à la formation de GSSH. Celui-ci serait transformé en sulfite par ETHE1 et la Rhodanèse produirait du thiosulfate, qui constituerait la forme d'élimination d'H₂S (Libiad *et al.*, 2014 ; Kabil et Banerjee, 2012).

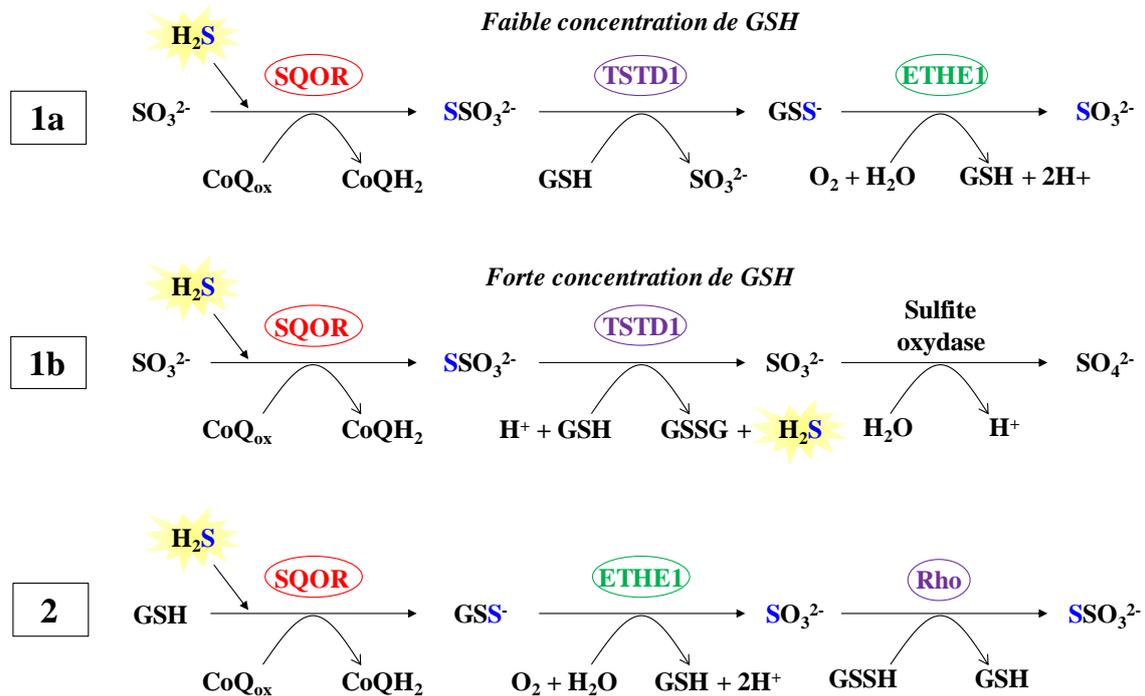


Figure 30. Mécanisme hypothétique du catabolisme d'H₂S par le complexe SOU selon l'hypothèse du Dr. Jorns (1) ou du Dr. Banerjee (2).

(1) Deux mécanismes sont proposés selon la concentration en GSH dans la mitochondrie, dans les deux cas la SQOR catalyse la transformation du sulfite en thiosulfate. (1a) En cas de faible concentration en GSH, le soufre du thiosulfate est transféré au GSH ce qui conduit à la formation de GSSH, celui-ci étant réduit en GSH par ETHE1 parallèlement à la formation de sulfite. (1b) En cas de forte concentration en GSH, la réaction catalysée par la TSTD1 conduit à la formation de glutathion oxydé (GSSG) et d'H₂S.

(2) La SQOR transforme le GSH en GSSH, deux moles de GSSH sont ensuite transformées en thiosulfate par l'action séquentielle d'ETHE1 et de la Rhodanèse.

3) Preuves expérimentales en faveur de l'implication des enzymes du complexe SOU

Le rôle du complexe SOU a été proposé à partir d'études de génomique et de caractérisation *in vitro* des différentes enzymes le composant sans que la formation d'un tel complexe n'ait été mise en évidence.

Synthèse bibliographique

Par contre, de nombreuses études prouvent l'implication des différentes enzymes qui le composent : à titre d'exemple, une expérience de délétion du gène *Ethel* chez la souris conduit à une accumulation d' H_2S dans l'organisme ce qui s'accompagne notamment d'une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Tiranti *et al.*, 2009). Un autre groupe a montré l'implication de la Rhodanèse dans l'élimination d' H_2S au niveau des cellules épithéliales du colon. L'incubation d'un homogénat de colonocytes en présence d'un anticorps spécifique de la Rhodanèse inhibe l'élimination d' H_2S (Picton *et al.*, 2002). Un argument fort concerne une étude de PCR quantitatives qui a démontré que la capacité des cellules épithéliales du colon à éliminer l' H_2S était directement corrélée à la production des transcrits correspondant aux enzymes SQOR, Rhodanèse et ETHE1 (Mimoun *et al.*, 2012).

II. La sulfure dioxygénase humaine ETHE1

Contrairement aux enzymes décrites ci-dessus, la sulfure dioxygénase est une protéine Fer-dépendante appartenant à la superfamille des metallo β -lactamases (MBL). C'est une enzyme ubiquitaire retrouvée dans les trois règnes du vivant. Elle est nommée ainsi chez l'Homme pour « ethylmalonic encephalopathy 1 protein », car la mutation du gène codant cette enzyme conduit à une maladie appelée encéphalopathie éthylmalonique. Différents aspects de cette enzyme seront discutés ci-après car cette enzyme intervient dans le catabolisme d' H_2S et a été étudiée dans le cadre du projet de thèse.

1) Structure tridimensionnelle d'ETHE1

Récemment, la structure d'ETHE1 en complexe avec l'atome de Fer a été obtenue à une résolution de 2,6 Å (4CHL). Le monomère possède un repliement caractéristique des MBL avec deux feuillets β centraux parallèle et antiparallèle chacun composé de six brins, ces feuillets sont entourés de chaque côté par trois hélices α . Dans cette structure, la cystéine catalytique est sous forme oxydée acide sulfénique et un ion Fer est fixé dans le site actif. Au niveau de la sphère de coordination octaédrale, il y a trois molécules d'eau, deux résidus histidine et un résidu aspartate. Des expériences de docking suggèrent que le canal d'accès au site actif est suffisamment large pour accommoder le GSSH (substrat de l'enzyme) (Figure 31) (Pettinati *et al.*, 2015).

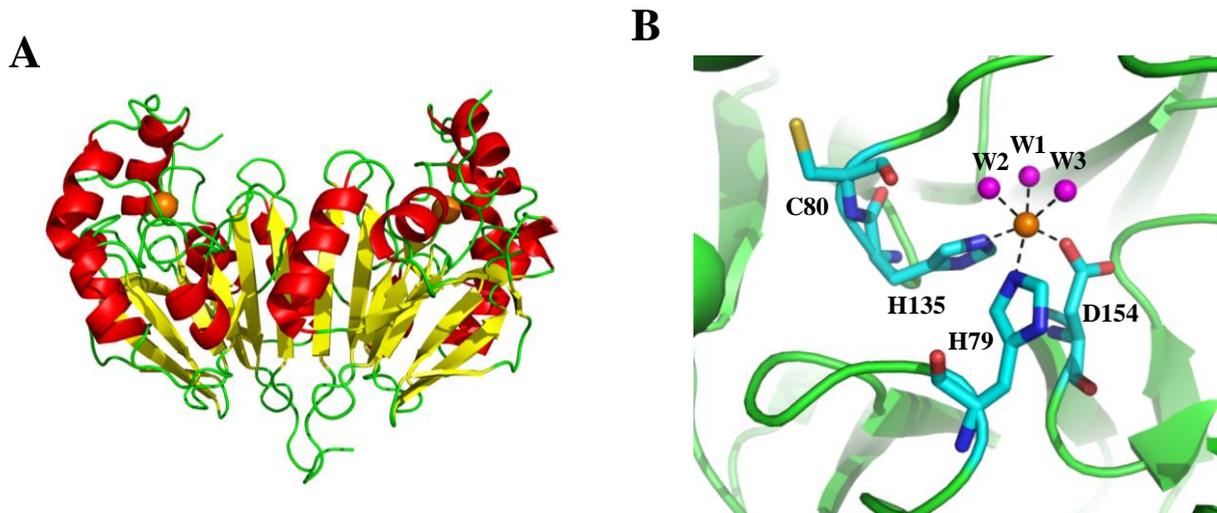


Figure 31. Représentation de la structure tridimensionnelle d'ETHE1 (A) et vue du site actif d'ETHE1 (B).

A : Vue globale de la structure tridimensionnelle d'ETHE1 avec les deux domaines présentant le repliement caractéristique des protéines de la famille des MBL. La chaîne principale est représentée en mode « rubans et flèches ». Les structures secondaires sont présentées selon le code couleur suivant : les feuillets β sont en jaune, les hélices α en rouge et les boucles en vert.

B : Vue du site actif d'ETHE1, sont représentées les trois molécules d'eau (W), les deux résidus His et le résidu Asp qui interviennent dans la coordination de l'atome de Fer. Les différents résidus sont représentés en « boules et bâtons » avec les atomes de carbone en bleu cyan, les atomes de soufre en jaune, l'atome d'oxygène en rouge et l'atome d'azote en bleu. L'atome de Fer est représenté en sphère orange et les molécules d'eau en sphères violettes.

D'autre part, les données de la littérature divergent concernant l'état oligomérique d'ETHE1 : des études de filtration sur gel analytique, de spectrométrie de masse en conditions natives (ionisation par électronébulisateur) et de diffusion de la lumière aux petits angles (SEC-MALS) montrent que ETHE1 est un homodimère à l'état natif (Pettinati *et al.*, 2015 ; Sattler *et al.*, 2015). Par contre, des expériences de filtration sur gel analytique antérieures étaient en faveur de l'existence d'un monomère en solution (Kabil et Banerjee, 2012).

D'autres structures de sulfure dioxygénase (SDO) d'organismes différents sont disponibles dans la PDB comme celles d'*Arabidopsis thaliana* à une résolution de 1,48 Å (2GCU) (McCoy *et al.*, 2006), de *Pseudomonas putida* et de *Myxococcus xanthus* à des résolutions de respectivement 1,5 et 2,5 Å (Sattler *et al.*, 2015). Comme pour ETHE1, ces structures possèdent un atome de Fer dans le site actif, les atomes responsables de la coordination du Fer sont superposables d'une structure à l'autre malgré l'existence de délétions ou d'insertions entre ces différentes SDO. De plus la présence d'une molécule de GSH dans la structure de la SDO de *Pseudomonas putida* a permis d'identifier des résidus potentiellement impliqués dans la fixation du substrat.

Synthèse bibliographique

2) Mécanisme et spécificités de substrats d'ETHE1

a) Mécanisme catalytique

ETHE1 catalyse l'oxydation O₂-dépendante du GSSH en sulfite et GSH. Un mécanisme catalytique a été proposé à partir de celui de la cystéine dioxygénase qui catalyse l'oxydation de la L-cystéine en cystéine sous forme acide sulfénique par l'utilisation de l'oxygène moléculaire (Figure 32).

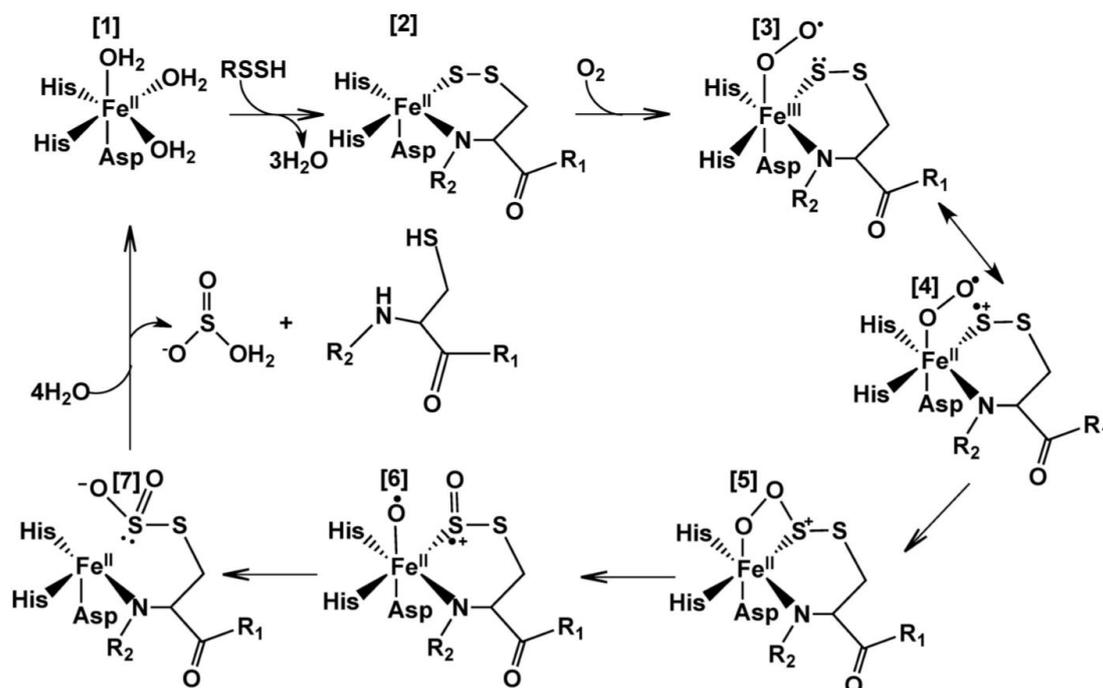


Figure 32. Mécanisme réactionnel proposé pour ETHE1 (Kabil et Banerjee, 2012).

En [1] est présenté le site actif à l'état fondamental c'est-à-dire avec l'atome de FerII. [2] Le substrat GSSH est coordonné par ancrage du soufre distal et de l'azote du GSSH au FerII. [3] Un complexe ternaire FerIII-superoxyde est formé. [4] Le soufre distal du GSSH acquiert un caractère radical cationique partiel. [5] Un intermédiaire cyclique est formé. [6] Le clivage de la liaison O-O conduit à la formation d'un cation sulfoxyde. [7] Le cycle catalytique se termine par la formation du sulfite et du GSH.

Sur la figure, RSSH, R₁ et R₂ représentent respectivement le GSSH, le glutamate du substrat et la glycine du GSSH.

Le mécanisme proposé est le suivant : la fixation du substrat déplace trois molécules d'H₂O de la sphère de coordination et elle est suivie de la liaison d'une molécule d'O₂ ce qui conduirait à la formation d'un complexe FerIII-superoxyde [3]. Le soufre distal du GSSH acquiert un caractère radical cation [4] *via* un mécanisme de résonnance et la recombinaison avec le complexe FerII superoxyde conduit à la formation d'un intermédiaire cyclique peroxyde [5]. Le clivage de la liaison O-O conduit à la formation du sulfoxydation [6] et l'activation de l'atome d'oxygène par le Fer conduit à la formation du sulfite [7] (Kabil et Banerjee, 2012).

b) Spécificités de substrats

Les paramètres cinétiques d'ETHE1 déterminés à l'état stationnaire indiquent que le substrat privilégié de cette enzyme est le GSSH. Néanmoins ETHE1 est capable d'utiliser d'autres substrats persulfures tels que le coenzyme A persulfure mais avec une activité spécifique cinquante fois moins importante par rapport à la réaction effectuée en présence de GSSH (Kabil et Banerjee, 2012). ETHE1 serait également capable d'utiliser les polysulfures dérivant du GSH (GS(S)_nH), mais pas la CysSSH ou l'homocystéine persulfure (Jung *et al.*, 2016).

3) Rôles physiologiques d'ETHE1

Dans le génome humain, un gène a été annoté comme codant la sulfure dioxygénase ETHE1, le loci de ce gène se situe sur le chromosome 19. ETHE1 possède une triple localisation mitochondriale (Tiranti *et al.*, 2004), nucléaire et cytosolique (Higashitsuji *et al.*, 2002). Lors de son import mitochondrial, il y a clivage de la séquence signal présente à son extrémité N-terminale entre les résidus Arg7 et Val8 ce qui permet l'activation de l'enzyme après son internalisation (Tiranti *et al.*, 2004).

ETHE1 joue un rôle central dans le métabolisme d'H₂S et l'homéostasie énergétique chez les mammifères (Kabil et Banerjee, 2012). En effet une déficience en ETHE1 conduit à une accumulation d'H₂S dans la cellule provoquant des effets délétères pour les organes vitaux tels que le foie, le cerveau, le cœur, les reins et les muscles. Une concentration élevée en H₂S dans la cellule inhibe l'activité de l'Acyl-CoA deshydrogénase et la cytochrome c oxydase, le knock-out du gène *Ethel* chez la souris provoque une accélération de la dégradation des sous-unités de la cytochrome c oxydase et une inhibition de l'hème a (forme retrouvée dans la cytochrome c oxydase) (Tiranti et Zeviani, 2013 ; Di Meo *et al.*, 2011).

Parallèlement, un rôle d'ETHE1 associé à sa localisation cytoplasmique/nucléaire a été proposé dans la régulation de l'apoptose dans la cellule. Plus précisément, ETHE1 jouerait le rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme. La dioxygénase humaine est capable de se fixer à la sous-unité RelA-p65 de NF-κB et ainsi de forcer sa séquestration dans le cytoplasme en favorisant son export nucléaire. La séquestration de NF-κB dans le cytoplasme ne passe pas par un mécanisme de masquage de la séquence de localisation dans le noyau (NLS) puisque la

Synthèse bibliographique

protéine ETHE1 se fixerait sur une autre zone à savoir sur la partie N-terminale de RelA. Ainsi la vitesse d'import nucléaire de NF- κ B suite à la phosphorylation de I κ B est inférieure à la vitesse d'export du noyau suite à la fixation d'ETHE1 (Figure 33).

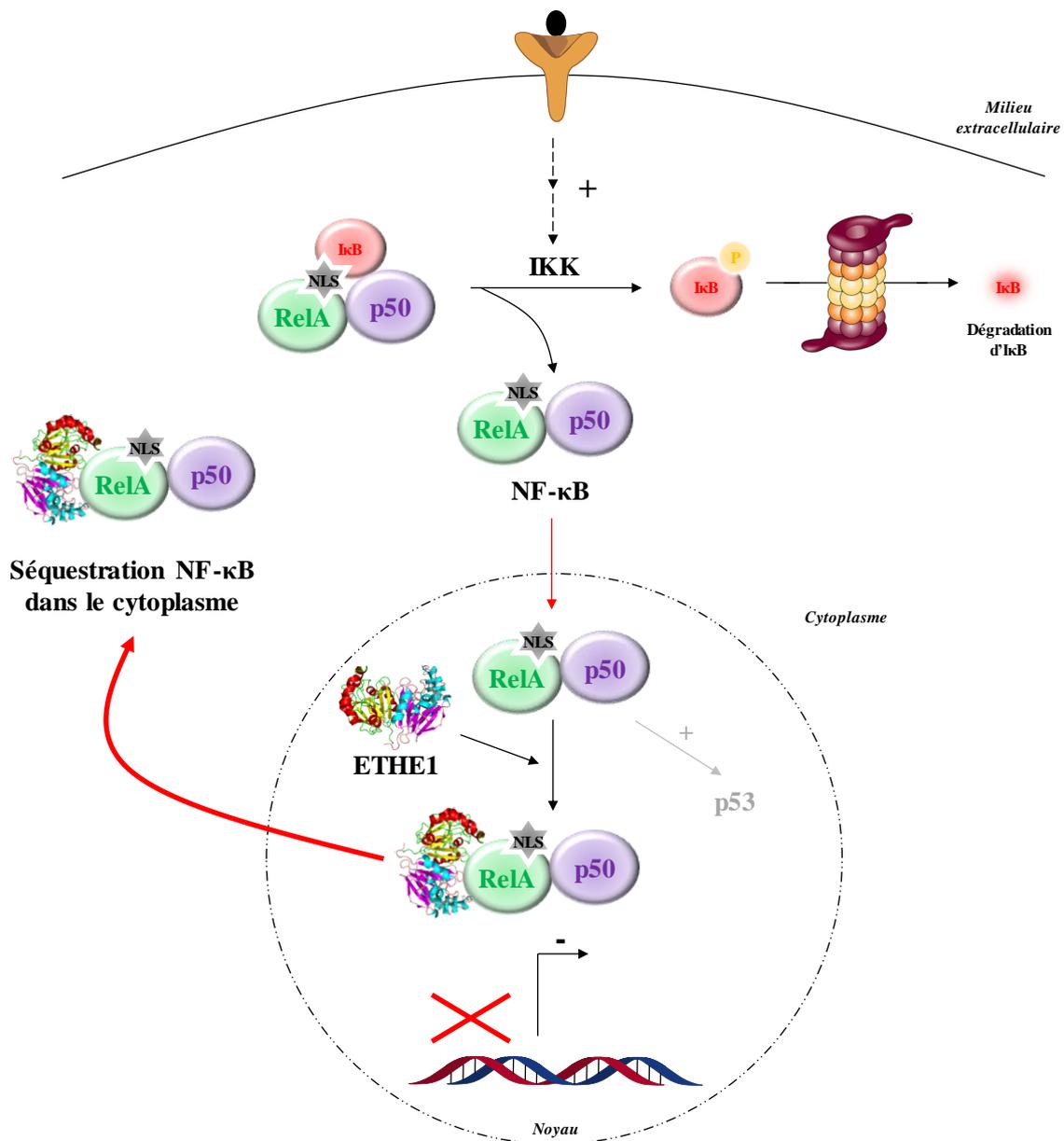


Figure 33. Mécanisme simplifié de l'inhibition de l'apoptose par ETHE1.

Par conséquent, une surexpression du gène *ETHE1* conduirait à la séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme et donc à une inhibition de l'apoptose induite par la protéine p53. De part ce rôle, ETHE1 serait également impliquée dans des processus physiopathologiques tel que l'hépatocarcinogénèse (Higashitsuji *et al.*, 2002).

L'encéphalopathie éthylmalonique (EE) est une pathologie infantile autosomale récessive rare qui se caractérise par un dérèglement du métabolisme affectant gravement certains organes tels que le cerveau, le tractus gastro-intestinal et les vaisseaux périphériques. Les symptômes de l'EE sont une encéphalopathie progressive, une acrocyanose orthostatique, et des diarrhées hémorragiques chroniques. Les symptômes neurologiques incluent une régression psychomotrice, une hypotonie axiale et des lésions nécrotiques au niveau de la matière grise profonde. L'EE est une maladie infantile provoquant la mort de l'individu dans les dix premières années de sa vie (Tiranti *et al.*, 2009).

D'un point de vue biochimique, l'EE implique une augmentation de la concentration intracellulaire d'H₂S ce qui provoque une baisse d'activité de la cytochrome c oxydase dans les muscles squelettiques et le cerveau, et une élévation du niveau de C4 et C5 acylcarnitines dans le sang du fait de l'inhibition de l'Acyl-CoA déshydrogénase. D'autres signes biochimiques sont associés tels qu'une acidité lactique dans l'organisme et une augmentation de l'excrétion urinaire d'acide éthylmalonique, de 2-methylsuccinate, d'isobutyrylglycine, d'isovaleryglycine et de thiosulfate (Tiranti *et al.*, 2009 ; Drousiotou *et al.*, 2011 ; Tiranti et Zeviani, 2013 ; Di Meo *et al.*, 2015).

La maladie EE est associée spécifiquement à la mutation du gène *ETHE1*. Récemment, un exemple de variant pathologique a été caractérisé : la substitution de l'Arg163 par une Gln ou un Trp dans la protéine, une mutation pathologique conduisant à : (1) une diminution de la stabilité thermique de la protéine ETHE1 ; (2) une augmentation de la sensibilité à la protéolyse et (3) une diminution du potentiel de réduction du centre Fer au niveau du site actif (Henriques *et al.*, 2014).

Objectifs de la thèse

Un des projets du groupe Redox à plus ou moins long terme est de décrypter les mécanismes moléculaires associés au métabolisme d'H₂S. Dans ce contexte, mon projet de thèse était consacré à l'étude détaillée des thioltransférases afin de mieux comprendre leurs rôles physiologiques. Mon projet a abordé deux questions majeures :

- La première concernait le mécanisme des réactions de transfert de soufre catalysées par les thioltransférases. Quelle est l'efficacité de ces réactions ? Quelles stratégies catalytiques sont utilisées pour assurer un transfert de S⁰ d'une liaison C-S vs. une liaison S=S vers une Cys ? Quelles sont les bases moléculaires impliquées dans la catalyse ?
- La seconde concernait les rôles physiologiques des thioltransférases humaines dans le métabolisme d'H₂S : une 3-MST à double localisation cytosolique et mitochondriale, et deux TST à localisation mitochondriale (TSTD1 et Rhodanèse). Cette question a été principalement abordée par la détermination des propriétés cinétiques de ces enzymes en présence de différents substrats donneur et accepteur.

Pour cela, j'ai réalisé l'étude *in vitro* du mécanisme des enzymes humaines (^h3-MST, Rhodanèse et TSTD1) et d'*Escherichia coli* (^{Ec}3-MST et GlpE), enzymes décrites comme étant actives et dont les structures cristallines étaient disponibles, hormis pour la TSTD1 et la Rhodanèse. J'ai mis au point des approches de cinétiques classiques, rapides, systèmes enzymatiques couplés. Parallèlement, des études de relations structure-fonction ont été réalisées afin d'identifier les résidus impliqués dans la catalyse et la spécificité structurale, ainsi que des études de spécificités de substrats.

Afin de compléter mes travaux d'enzymologie, plusieurs collaborations ont été entreprises : avec le Pr. O. Ventura (Montevideo, Uruguay) pour l'étude par chimie théorique de la réaction de transfert de soufre sur une réaction modèle, avec l'équipe des Drs. F. Favier et C. Didierjean (CRM² – Université de Lorraine) pour la détermination de la structure tridimensionnelle de la TSTD1, et avec le Pr. Pascal Reboul (IMoPA, Equipe IDePRAP) pour des études au niveau cellulaire. Les résultats, parfois préliminaires, ainsi obtenus seront discutés en relation avec les résultats d'enzymologie.

Résultats

Chapitre I. Travaux préliminaires

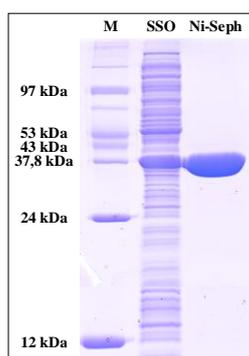
Ces études ont nécessité de disposer d'enzymes en grande quantité. Les protocoles permettant d'obtenir les thioltransférases d'*E. coli* étant disponibles dans l'équipe, j'ai établi les protocoles de production et de purification des enzymes humaines (3-MST, TSTD1 et Rhodanèse). Pour cela, les enzymes ont été produites sous forme fusionnées à une étiquette polyHis de façon à pouvoir les purifier par affinité sur colonne de Ni. De plus, il était indispensable de mettre au point les techniques cinétiques permettant de déterminer les constantes de vitesse associées aux différentes étapes du mécanisme des thioltransférases.

I. Production et purification des thioltransférases humaines

1) La 3-MST

La ^h3-MST est produite sous forme soluble à partir d'un vecteur pET28b ^h3-MST dans des cellules BL21 (DE3). Le vecteur pET28b ^h3-MST a été obtenu par sous-clonage de la séquence codante d'intérêt à partir du vecteur commercial pOTB7 ^h3-MST. Un protocole de purification en 2 étapes a été mis au point : (1) lyse cellulaire par sonication permettant de récupérer l'enzyme dans la fraction soluble, (2) chromatographie d'affinité Ni-Sephrose (élution à 225 mM d'imidazole) (Figure 34).

A



B

Etapes	Volume	DO _{280 nm}	DO _{280 nm} totale	DO _{260 nm}	Ratio DO _{280/260}
SSO	135	88	11 880	161	0,55
Ni-Seph	25	17,2	431	9,4	1,84

Figure 34. Analyse des étapes de purification de la forme sauvage de la ^h3-MST par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 12,5% (A) et tableau récapitulatif de la purification (B).

La purification a été réalisée à partir de 4 litres de culture de cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) en milieu LB/K.
M : marqueur de taille contenant l'ARN polymérase T7 (97 kDa), la rétinol déshydrogénase (53 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la GAPDH (37,8 kDa), la MsrA (24 kDa) et la Trx (12 kDa).
SSO : surnageant de sonication, Ni-Seph : éluât de la colonne Ni-Sephrose.

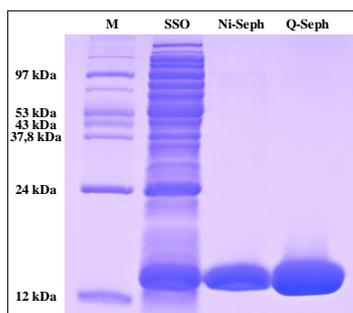
Résultats

Ce protocole a permis d'obtenir la forme sauvage ainsi que les mutants de la ^{h3}-MST purifiés à homogénéité et en grande quantité (~70 mg/L de culture).

2) La TSTD1

Le vecteur pET28b TSTD1 a été obtenu par sous-clonage de la séquence codante, optimisée pour la production hétérologue dans *E. coli* (GeneArt®, ThermoFisher Scientific), ce vecteur a été utilisé pour la production de l'enzyme dans des cellules C41 (DE3). Le protocole de purification se compose de trois étapes : (1) lyse cellulaire par sonication permettant de récupérer l'enzyme dans la fraction soluble, (2) chromatographie d'affinité Ni-Sepharose (élution à 200 mM d'imidazole), et (3) chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose (élution à 250 mM de KCl). Ce protocole a permis d'obtenir la forme sauvage et les mutants de la TSTD1 purifiés à homogénéité et en grande quantité (~125 mg/L de culture) (Figure 35).

A



B

Etapes	Volume	DO _{280 nm}	DO _{280 nm} totale	DO _{260 nm}	Ratio DO _{280/260}
SSO	140	57	7900	99	0,57
Ni-Seph	50	10,8	544	7,3	1,48
Q-Seph	30	13,7	411	13,7	1,69

Figure 35. Analyse des étapes de purification de la forme sauvage de la TSTD1 par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 15% (A) et tableau récapitulatif de la purification (B).

La purification a été réalisée à partir de 4 litres de culture de cellules d'*E. coli* C41 (DE3) en milieu LB/K. M : marqueur de taille contenant l'ARN polymérase T7 (97 kDa), la rétinol déshydrogénase (53 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la GAPDH (37,8 kDa), la MsrA (24 kDa) et la Trx (12 kDa). SSO : surnageant de sonication, Ni-Seph : éluât de la colonne Ni-Sepharose, Q-Seph : éluât de la colonne Q-Sepharose.

3) La Rhodanèse

Le vecteur pET28b Rhodanèse a été obtenu par sous-clonage, dans le pET28b de la séquence codante optimisée pour la production dans *E. coli* (Life Technologies SAS). L'analyse des premiers tests de production réalisés dans des cellules BL21 (DE3) en milieu LB à 37°C, a révélé que l'enzyme produite était très majoritairement présente sous forme insoluble dans le culot de sonication, comme montré sur le profil électrophorétique de la Figure 36. Le fait que cette protéine ait déjà été produite sous forme recombinante dans *E. coli* (Libiad *et al.*, 2014) suggérerait qu'elle pouvait être obtenue sous forme soluble en modifiant les conditions de

production. Pour cela, deux protocoles permettant d'induire la synthèse de protéines chaperonnes contribuant au repliement des protéines ont été testés : (1) un choc à l'éthanol et un stress thermique (protocole éthanol) ; (2) un stress osmotique et un stress thermique (protocole LBNB). Les profils électrophorétiques mettent en évidence que seul le protocole LBNB permet d'obtenir de la Rhodanèse sous forme soluble (Figure 36). Les productions à plus grande échelle de la Rhodanèse ont donc été réalisées dans la souche BL21(DE3), en milieu de culture LB, en suivant le protocole LBNB.

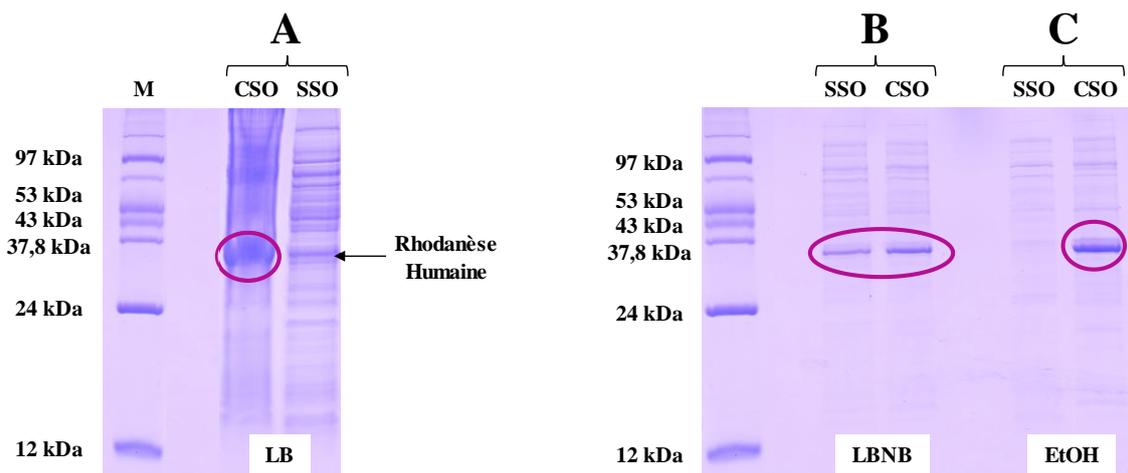


Figure 36. Analyse par gel SDS-PAGE 12,5% des tests de production de la Rhodanèse.

Des cultures d'*E. coli* BL21 (DE3) transformées par le plasmide pET28b Rhodanèse ont été ensemencées au 1/100^{ème} en milieu LB/K et placée à 37°C, sous agitation. Trois protocoles ont été utilisés :

A : L'induction est effectuée à une DO_{600nm} de 0,6 avec 1 mM d'IPTG puis l'incubation se fait à 37°C toute la nuit.

B : A une DO_{600nm} de 0,6, l'ajout de 0,5 M de chlorure de sodium permet d'induire un stress osmotique sur les cellules et l'ajout de 2 mM de bétaïne permet de les protéger. Ensuite la culture est incubée à 47°C pendant 1 heure sous agitation (stress thermique). Les cellules sont ensuite placées à 20°C sous agitation pendant 1 heure avant ajout de 1 mM d'IPTG, puis les cellules sont incubées à 20°C toute la nuit (Oganesyan *et al.*, 2007).

C : Lorsque la culture atteint une DO_{600nm} de 0,6, l'ajout de 3% d'éthanol permet de stimuler la synthèse de molécules chaperonnes suite à ce stress cellulaire. Les cellules sont ensuite soumises à un stress thermique lorsqu'elles sont placées à 4°C pendant 2 heures. L'induction est effectuée avec 0,2 mM d'IPTG puis les cellules sont incubées à 20°C toute la nuit (Thomas et Baneyx, 1996).

MW : marqueur de taille contenant l'ARN polymérase T7 (97 kDa), la rétinol déshydrogénase (53 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la GAPDH (37,8 kDa), la MsrA (24 kDa) et la Trx (12 kDa). SSO : surnageant de sonication. Ni : éluât de la colonne Ni-Sepharose. SP-Séph : éluât de la colonne SP-Sepharose. La Rhodanèse est retrouvée au niveau de la bande de 37 kDa.

Un protocole de purification en 3 étapes a été mis au point : (1) lyse cellulaire par sonication permettant de récupérer l'enzyme dans la phase soluble, (2) chromatographie d'affinité Ni-Sepharose (élution à 350 mM d'imidazole) et (3) une chromatographie échangeuse de cations SP-Sepharose (élution à 750 mM de KCl). Ce protocole permet d'obtenir la forme sauvage de la Rhodanèse purifiée à homogénéité (~4 mg/L de culture) (Figure 37). Ce rendement modeste peut être expliqué par la relative instabilité de la Rhodanèse liée à une surface accessible hydrophobe relativement importante pour une protéine globulaire. En effet,

Résultats

la Rhodanèse est fortement retenue sur une matrice hydrophobe (Phenyl-Sepharose, non montré). Cette propriété de la Rhodanèse pourrait être nécessaire à son rôle dans l'import de l'ARN 5S mitochondrial (Smirnov *et al.*, 2008).

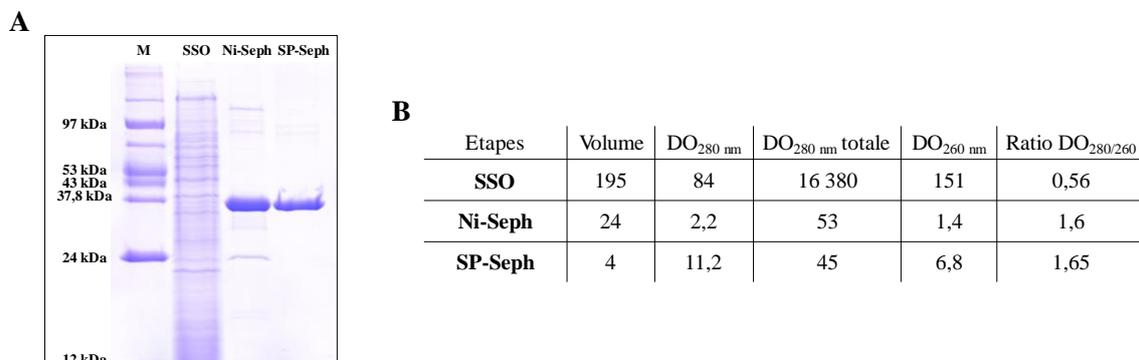


Figure 37. Analyse des étapes de purification de la Rhodanèse par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 12,5% (A) et tableau récapitulatif de la purification (B).

La purification a été réalisée à partir de 4 litres de culture de cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) en milieu LB/K. M : marqueur de taille contenant l'ARN polymérase T7 (97 kDa), la rétinol déshydrogénase (53 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la GAPDH (37,8 kDa), la MsrA (24 kDa) et la Trx (12 kDa). SSO : surnageant de sonication, Ni-Seph : éluât de la colonne Ni-Sepharose et SP-Seph : éluât de la colonne SP-Sepharose.

II. Mise au point des méthodes d'étude des réactions de transfert de soufre

Dans la suite de ce paragraphe, seules seront expliquées les méthodes utilisées pour toutes les thioltransférases (Figure 38).

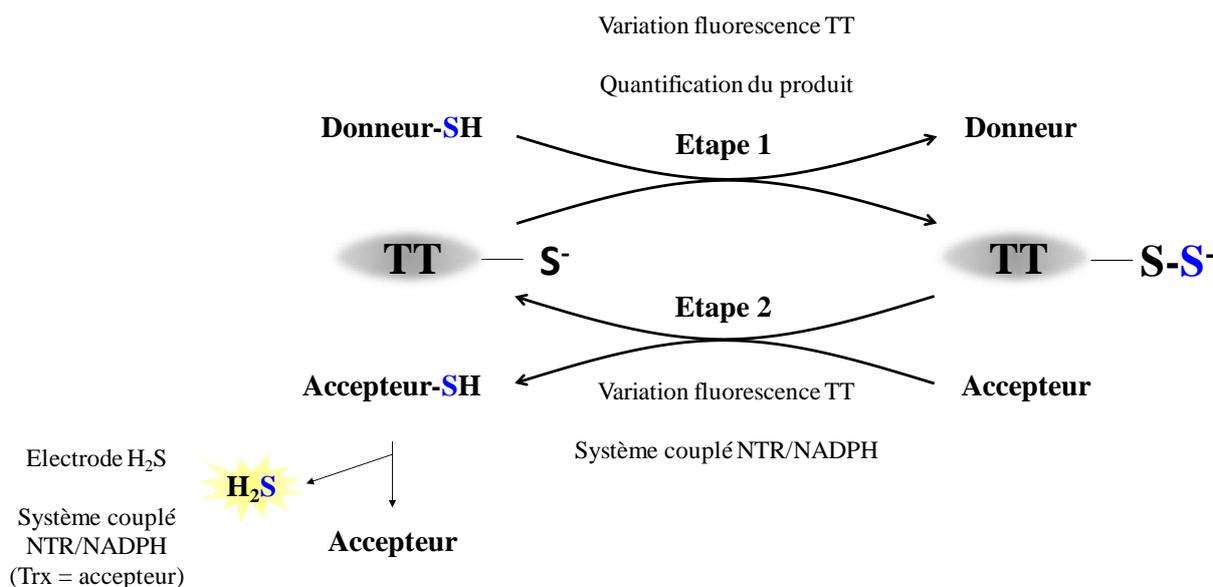


Figure 38. Les différentes stratégies utilisées pour étudier la réaction catalysée par les thioltransférases (TT) et les deux étapes de transfert de soufre indépendamment.

1) Cinétiques des réactions à l'état stationnaire

La détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire nécessite de pouvoir quantifier un des substrats ou produits en fonction du temps, et en présence d'un accepteur à thiol, les réactions conduisent toutes à la libération d'H₂S. Les méthodes classiquement utilisées dans la littérature reposent sur la formation de dérivés quantifiables d'H₂S, comme par exemple le complexe PbS formé entre PbNO₃ et H₂S qui absorbe à 360 nm. Cependant, des études préliminaires réalisées dans l'équipe ont montré que cette méthode conduisait à une surestimation de la concentration en H₂S libéré (résultats non montrés). Une électrode spécifique d'H₂S ayant fait son apparition sur le marché (Lazar Research Laboratories, INC.), il était nécessaire d'évaluer la possibilité de l'utiliser pour suivre les réactions enzymatiques (Figure 39).

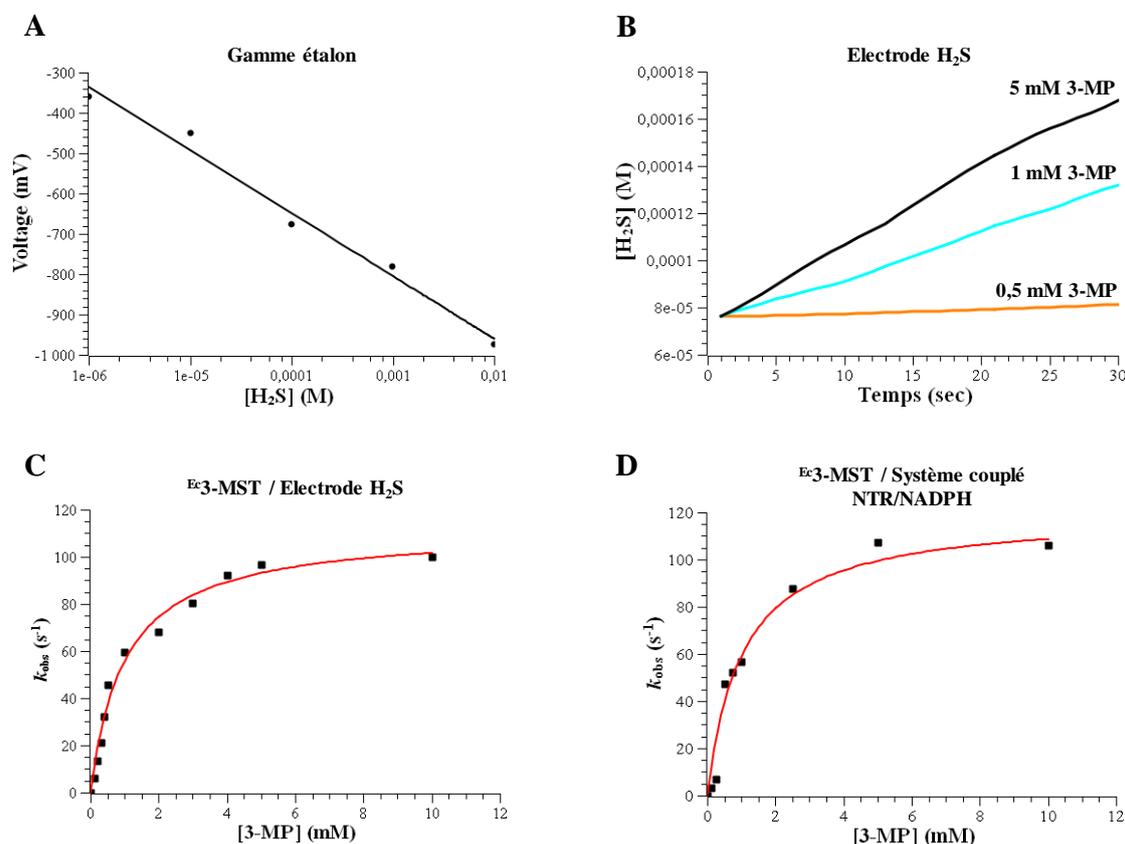


Figure 39. Etude de la réaction catalysée à l'état stationnaire par les 3-MST en présence de 3-MP et de Trx.

A : Gamme étalon de l'électrode H₂S obtenue pour des concentrations en H₂S allant de 10⁻² à 10⁻⁶ M. Les valeurs expérimentales (●) sous forme logarithmique ont été ajustées à l'équation d'une droite (Équation 3). Cette gamme étalon a été réalisée à pH 8 afin de se placer dans les mêmes conditions que pour les réactions enzymatiques.

B : Vitesses initiales mesurées *via* l'utilisation de l'électrode H₂S en présence de 10⁻⁸ M de Ec₃-MST, de 250 µM de Trx et de 0,5, 1 et 5 mM de 3-MP pour respectivement les traces orange, cyan et noir.

C et D : Graphiques $k_{obs} = f([3-MP])$ obtenus par l'utilisation de l'électrode H₂S (C) et par le système couplé NTR/NADPH (D). Les données expérimentales (■) ont été ajustées à l'équation de Michaelis-Menten (Équation 1) ce qui permet de déterminer le k_{cat} de la réaction et le K_M pour le 3-MP.

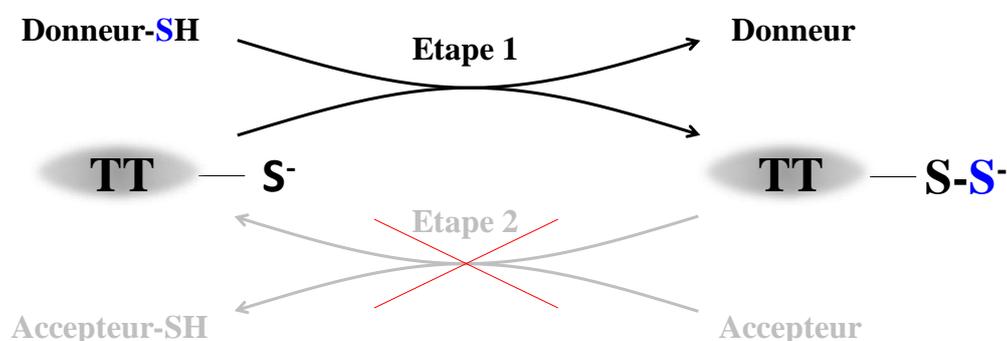
Résultats

Cette sonde s'étant avérée suffisamment sensible pour détecter des concentrations de l'ordre du micromolaire, l'utilisation d'une gamme étalon a permis l'obtention des valeurs des constantes de vitesse observées (k_{obs}).

En présence de Trx comme accepteur, l'utilisation du système couplé classique (NTR/NADPH) a permis comme attendu d'obtenir des valeurs de k_{cat} et K_M comparables à celles obtenues en utilisant la sonde H_2S .

2) Cinétiques de la première étape de transfert de soufre

La réaction de transfert de soufre du donneur vers les thioltransférases a été étudiée dans des conditions de cycle catalytique unique, c'est-à-dire en se plaçant en absence d'accepteur afin de bloquer la réaction et d'accumuler l'intermédiaire persulfure.



L'approche a consisté à exploiter les modifications des propriétés d'émission de fluorescence des résidus Trp des enzymes (Trp + Tyr pour la TSTD1), liées au passage de la forme réduite à la forme persulfure. En effet, l'examen des spectres d'émission de fluorescence de ces enzymes sous formes réduite et persulfure montrait que la formation de l'intermédiaire persulfure entraînait une diminution de l'intensité de l'émission de fluorescence. Pour pouvoir suivre cette diminution au cours du temps, les constantes de vitesse associées à la première étape étant élevées, un appareil de cinétique rapide (stopped-flow) a été utilisé. Les cinétiques observées ont été ajustées à une équation correspondant à une exponentielle décroissante couplée à une droite (Équation 7) afin d'obtenir les valeurs des constantes de vitesse observée (k_{obs}) (Figure 40).

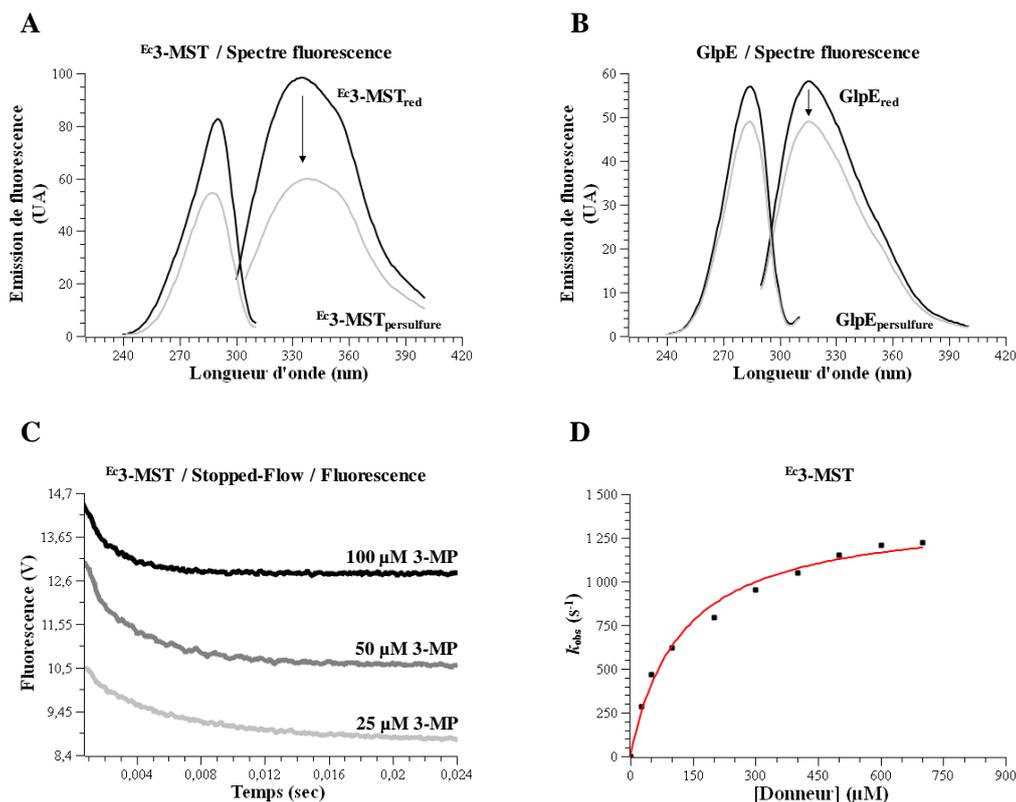


Figure 40. Étude de la première étape de transfert de soufre par suivi de la variation d'émission de fluorescence des thioltransférases.

A : Spectre de fluorescence d'émission et d'excitation de la $Ec3-MST$. Ce spectre a été réalisé en présence de 10 μM de $Ec3-MST$ réduite (noir) et sous forme persulfure (gris) dans du tampon A.

B : Spectre de fluorescence d'émission et d'excitation de la $GlpE$ d'*E. coli*. Ce spectre a été réalisé en présence de 10 μM de $GlpE$ réduite (noir) et sous forme persulfure (gris) dans du tampon A.

C : Exemples de variations de fluorescence obtenues dans du tampon A en présence de 1 μM de $Ec3-MST$ et de 25, 50 et 100 μM de 3-MP pour respectivement les traces gris clair, gris foncé et noir. Ces traces de fluorescence ont été ajustées à l'équation d'une exponentielle décroissante couplée à une droite (Équation 7). La constante de vitesse associée au deuxième événement est constante et indépendante de la catalyse, ceci ayant été vérifié avec le mutant $Ec3-MST$ C237A.

D : Graphique $k_{obs} = f([3-MP])$ pour la $Ec3-MST$. Les données expérimentales (■) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la première étape k_{max1} et la constante d'affinité apparente K pour le substrat testé.

Afin de vérifier que le suivi de la variation de fluorescence permet bien de suivre la vitesse de la première étape de transfert de soufre, une méthode cinétique de quantification du produit de la réaction a été développée. Ainsi, la cinétique d'apparition du pyruvate a été étudiée par une technique de quenched-flow pour la $Ec3-MST$. Après mélange de l'enzyme avec le 3-MP, l'acidification du mélange réactionnel à différents temps d'incubation permet, en dénaturant l'enzyme, de bloquer la réaction très rapidement (à partir de 2,5 ms). La quantification du pyruvate formé est réalisée par séparation sur colonne phase inverse C18 couplée à l'utilisation d'une gamme étalon (de 0 à 500 μM de pyruvate) (Figure 41). Les résultats obtenus montrent que la première étape est trop rapide pour que l'on puisse déterminer la constante de vitesse par cette méthode ($k_{obs} > 350 s^{-1}$). Par contre, l'étude du mutant $Ec3-MST$

Résultats

H66A en présence d'une concentration en 3-MP de 2 mM a permis de déterminer un k_{obs} de 15 s^{-1} comparable à celui obtenu par fluorescence dans les mêmes conditions (21,9 s^{-1}).

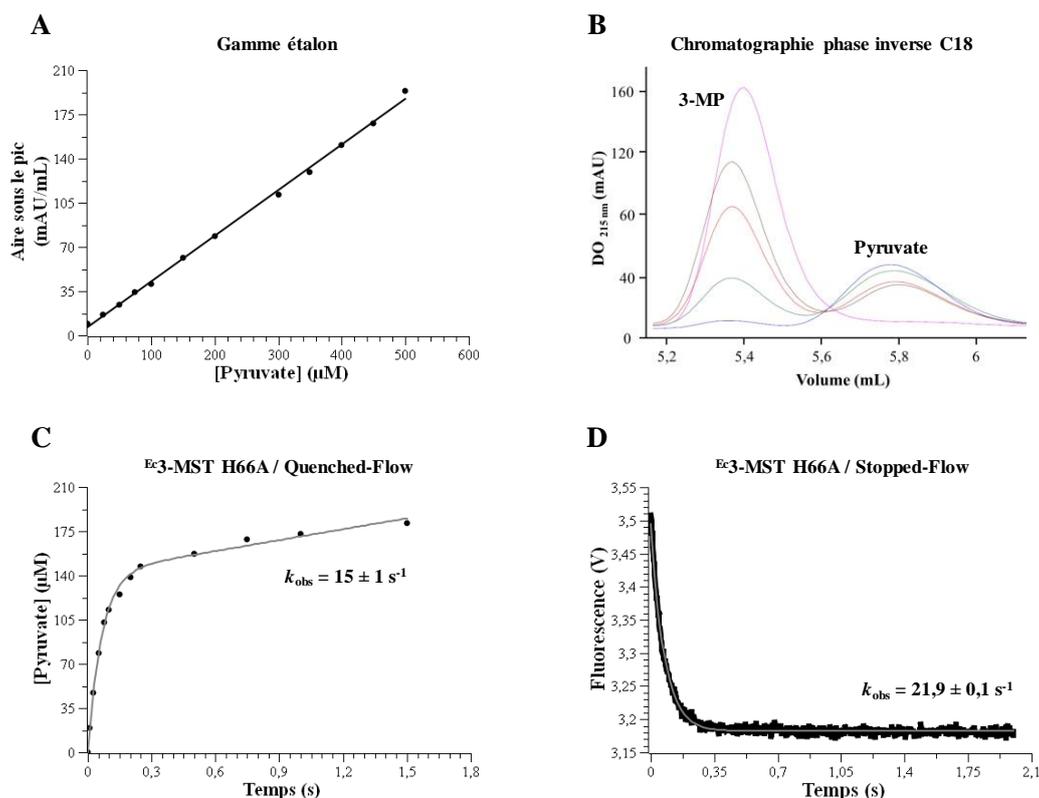


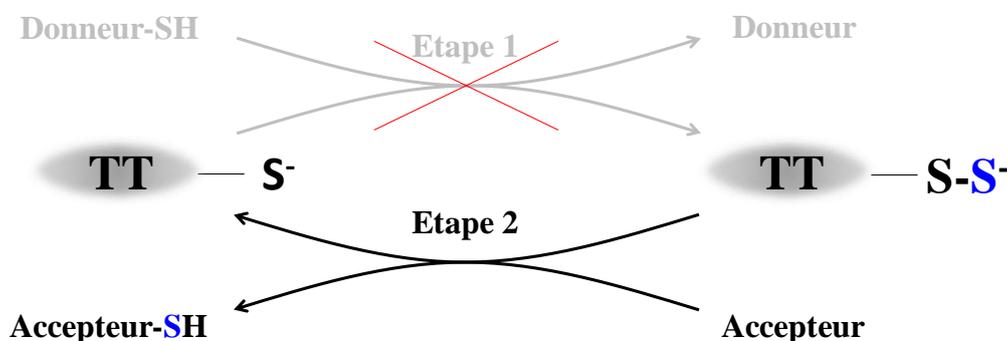
Figure 41. Étude de la première étape de transfert de soufre pour la *Ec3-MST H66A*.

A : Aire sous le pic (215 nm) = f ([pyruvate]). Les valeurs expérimentales (●) ont été ajustées à l'Équation 10.
B : Exemple de profils d'élution obtenus après arrêt de la réaction entre le mutant H66A (215 μM) et le 3-MP (2 mM) à 5 ms (bleu), 10 ms (vert), 25 ms (rouge), 50 ms (marron) et 100 ms (violet). Le pyruvate est élué à environ 5,4 mL tandis que le 3-MP est élué à environ 5,8 mL.
Le mélange réactionnel est acidifié par ajout de 3% de PCA pour stopper la réaction, et après une étape de centrifugation, le surnageant est injecté sur une colonne C18 Atlantis (Waters) couplée à un système Aktä Explorer (GE Healthcare). L'élution a été réalisée par un flux isocratique de tampon phosphate 50 mM à pH 2, et la détection est réalisée en suivant l'absorbance à 215 nm.
C : Les données expérimentales (●) ont été ajustées à l'équation d'une exponentielle croissante couplée à une droite (Équation 11). La phase linéaire reflète le fait que le 3-MP peut également jouer le rôle d'accepteur de soufre. Les paramètres cinétiques déterminés sont $k_{\text{obs}} = 15 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, et la constante de vitesse de la phase linéaire est de $0,30 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$. La réaction a été réalisée en présence de 215 μM de *Ec3-MST H66A* et 2 mM de 3-MP.
D : Variation de fluorescence (en noir) obtenu après mélange de 5 μM de *Ec3-MST H66A* et de 2 mM de 3-MP. Le signal de fluorescence a été ajusté à l'équation d'une exponentielle décroissante couplée à une droite (Équation 7) conduisant à l'obtention d'un k_{obs} de $21,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$.

La technique par suivi de la variation de fluorescence permet donc de déterminer la vitesse de la première étape de la réaction. Cette méthode, rapide d'application et peu consommatrice en enzyme, a été utilisée pour étudier cette étape de transfert de soufre pour toutes les thioltransférases en présence de différents substrats donneurs de soufre. L'ajustement des valeurs de k_{obs} obtenues pour différentes concentrations en substrat à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) a permis de déterminer les valeurs de la constante d'affinité apparente pour le substrat donneur (K) et de la constante de vitesse maximale (k_{max1}).

3) Cinétiques de la deuxième étape de transfert de soufre

Comme pour la première étape, la réaction a été étudiée dans des conditions de cycle catalytique unique, c'est-à-dire en utilisant l'enzyme sous forme persulfure et l'accepteur.



Pour cela, la variation d'émission de fluorescence des thioltransférases liée au passage de la forme persulfure à la forme thiol de la cystéine catalytique a été exploitée pour l'ensemble des accepteurs de soufre à l'exception de la Trx (Figure 42).

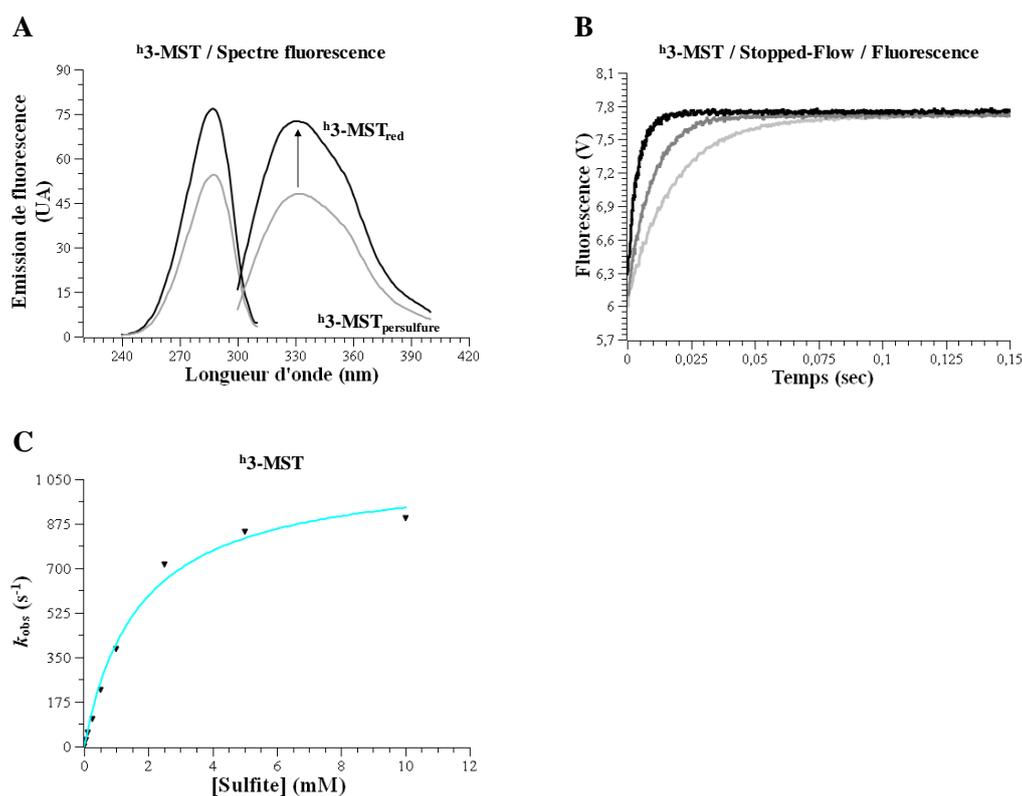


Figure 42. Etude de la deuxième étape de transfert de soufre de la ^h3-MST en présence de sulfite.

A : Spectre de fluorescence d'émission et d'excitation de la ^h3-MST. Ce spectre a été réalisé en présence de 10 μM de ^h3-MST réduite (noir) et sous forme persulfure (gris) dans du tampon A.

B : Exemples de variations de fluorescence. La réaction a été réalisée dans du tampon A en présence de 1 μM de ^h3-MST et de 0,1, 0,25 et 0,5 mM de sulfite pour respectivement les traces gris clair, gris foncé et noir.

C : Graphique $k_{obs} = f$ ([sulfite]). Les données expérimentales (▼) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la deuxième étape k_{max2} et la constante d'affinité apparente K pour le sulfite.

Résultats

En présence de Trx, la stratégie initiale consistait à exploiter la variation d'émission de fluorescence de la Trx, liée au passage de la forme réduite à oxydée, approche qui a déjà été utilisée au sein de l'équipe sur d'autres enzymes. De façon inattendue aucune variation de fluorescence n'a été observée, ceci pouvant être la conséquence dans les conditions utilisées d'amplitudes comparables pour les signaux de fluorescence associés aux transitions thioltransférase persulfure \rightarrow réduite et Trx réduite \rightarrow oxydée (Figure 43).

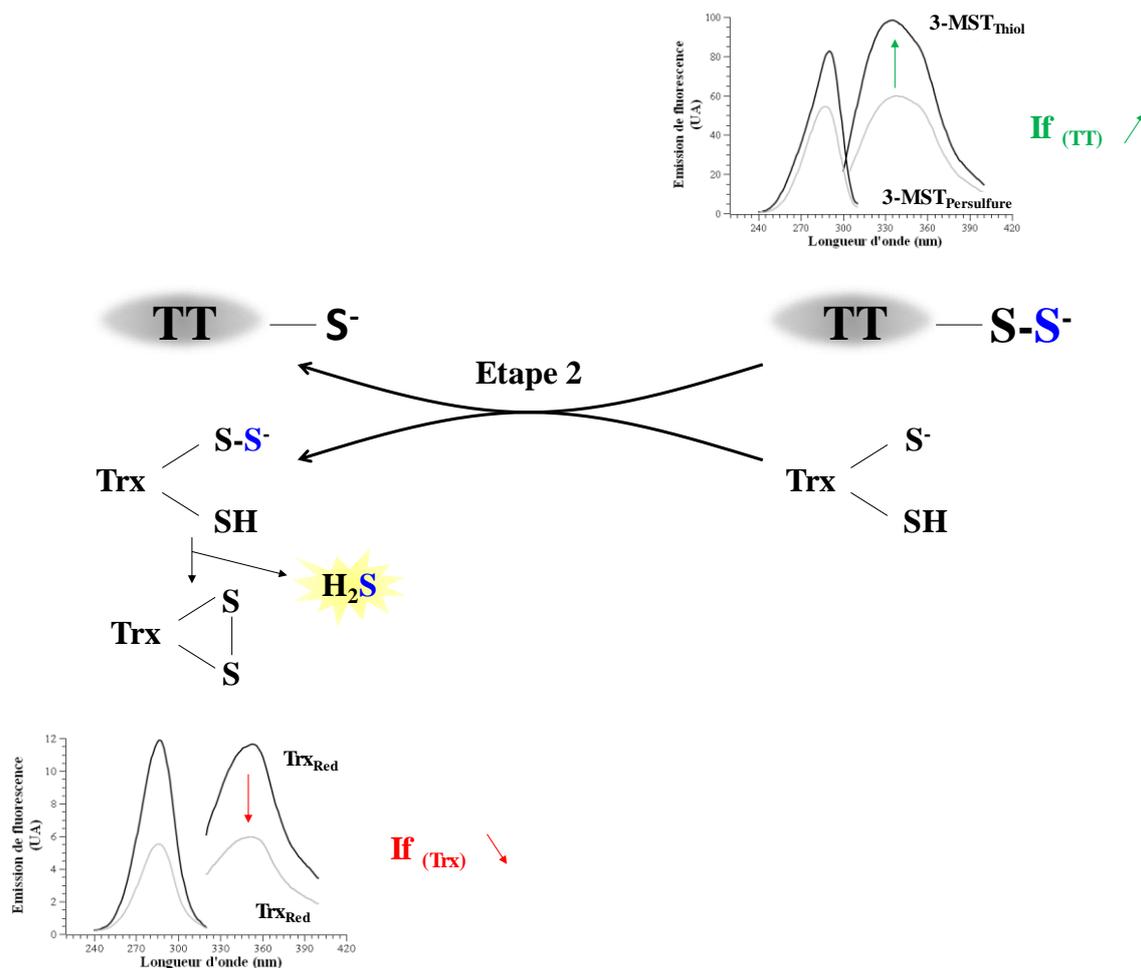


Figure 43. Variations de fluorescence intrinsèques des TT et de la Trx lors du transfert de soufre.

L'alternative a consisté à suivre la variation d'absorbance à 340 nm en utilisant le système couplé NTR/NADPH. Ainsi, la réaction entre la thioltransférase sous forme persulfure et la Trx réduite conduit à la formation de Trx oxydée, qui sera ensuite réduite par la NTR avec oxydation concomitante du NADPH. Les signaux obtenus sont biphasiques : la première phase représente la réduction de la Trx oxydée par la NTR, la seconde une réaction secondaire entre la NTR et l' HS^- formé simultanément à la Trx oxydée. Comme attendu, l'amplitude de la première phase est proportionnelle à la concentration en thioltransférase persulfure et la constante de vitesse associée (k_{obs}) correspond à la seconde étape de transfert de soufre, incluant

l'étape de formation d' HS^- à partir de la Trx sous forme persulfure (Figure 43). Dans les conditions utilisées, cette approche est limitée par la vitesse maximale du système couplé (k_{obsmax} de 20 s^{-1}). Ainsi, elle n'a pu être utilisée que pour la $^{\text{h3}}$ -MST, la réaction de transfert de soufre étant trop rapide pour l'enzyme d'*E. coli* (Figure 44).

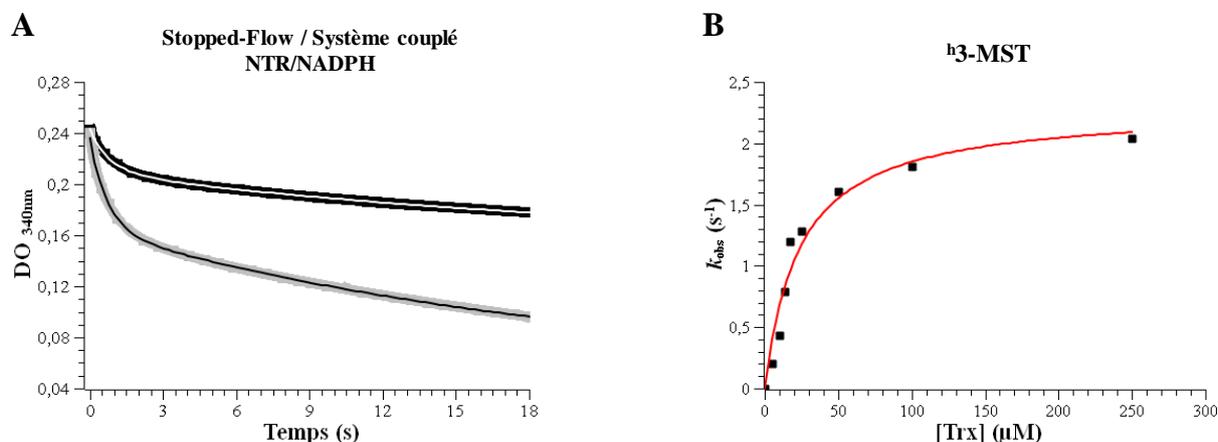


Figure 44. Etude de la deuxième étape de transfert de soufre de la $^{\text{h3}}$ -MST en présence de Trx.

A : Exemples de variations d'absorbance en fonction du temps obtenues après mélange de 5 (trace noire) ou 10 μM (trace grise) de $^{\text{h3}}$ -MST sous forme persulfure et de 50 μM de Trx. Les traces d'absorbances ont été ajustées à l'équation d'une bi-exponentielle (Équation 13) respectivement en blanc pour la condition 5 μM de $^{\text{h3}}$ -MST et noir en présence de 10 μM de $^{\text{h3}}$ -MST.

B : Graphique $k_{\text{obs}} = f([\text{Trx}])$. Les données expérimentales (■) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la deuxième étape k_{max2} et la constante d'affinité apparente K pour la Trx.

Parmi les accepteurs testés, deux n'étaient pas disponibles commercialement : le GSH persulfure (GSSH) et la cystéine persulfure (CysSSH). La seule méthode de synthèse décrite conduisait à la formation d'un mélange GSSH/CysSSH et GSH/Cys (Jung *et al.*, 2016 ; Kabil et Banerjee, 2012). Il était donc indispensable de mettre au point un nouveau protocole de synthèse de ces entités persulfures. L'approche a consisté à activer le groupement thiol du GSH et de la Cys, *via* la formation d'un pont disulfure mixte avec un groupement thiopyridine (1), pour obtenir les formes persulfures après réaction avec HS^- (2). Celles-ci sont ensuite purifiées par chromatographie échangeuse d'anions permettant l'élimination du thiopyridine en excès et une chromatographie d'exclusion stérique conduit à l'élimination du sulfure d'hydrogène en excès. La quantification est réalisée par réaction du composé formé avec un excès d'un agent réducteur tel que le DTT suivie de la quantification du sulfure d'hydrogène produit par l'utilisation de l'électrode H_2S (Figure 45).

Résultats

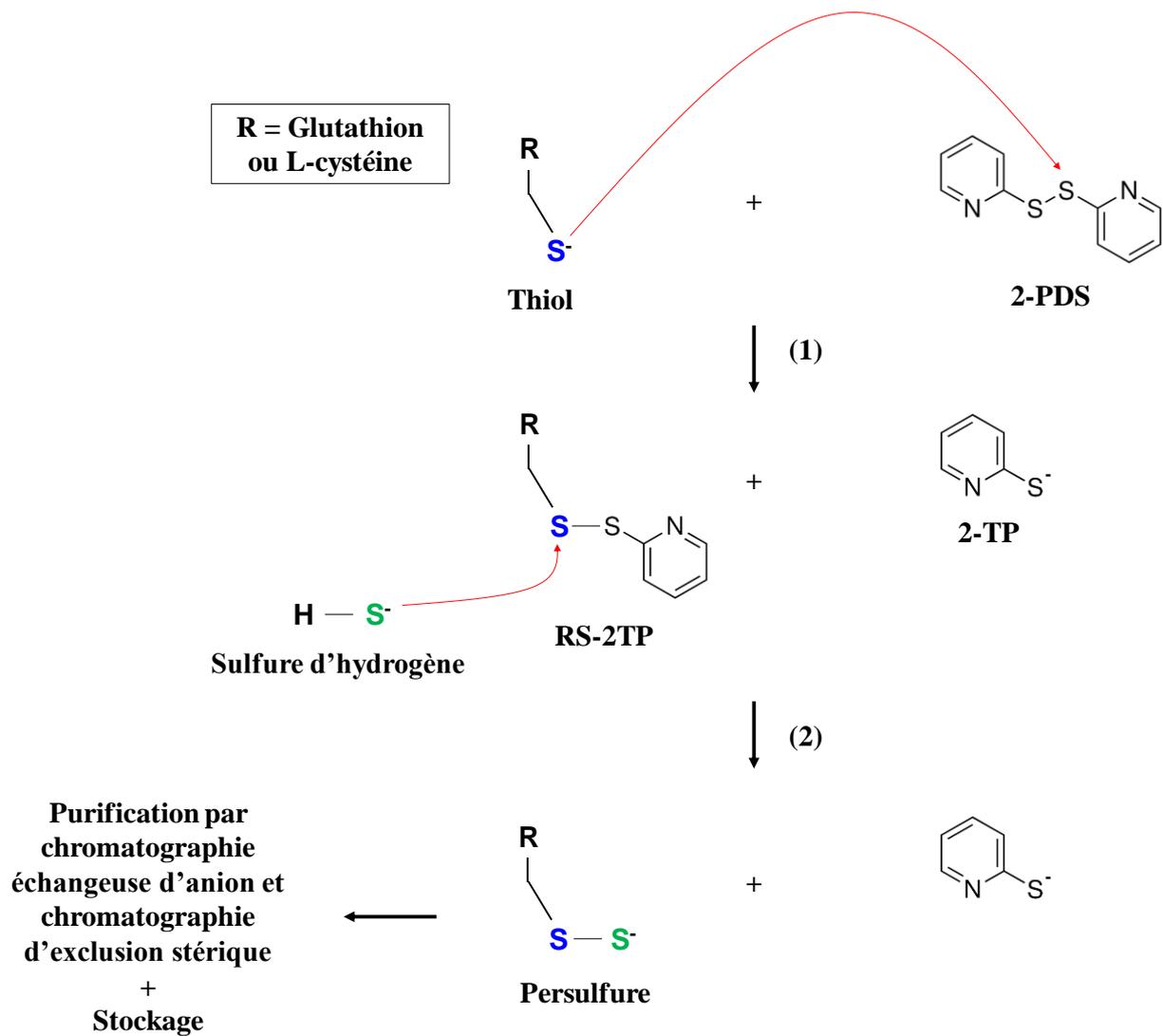


Figure 45. Méthode de production/purification des composés persulfures GSSH et CysSSH.

Chapitre II. Catalyse de formation de l'intermédiaire persulfure

Deux substrats donneurs de soufre préférentiels sont décrits pour les thioltransférases : le 3-MP pour les 3-MST et le TS pour les TST (Figure 46).

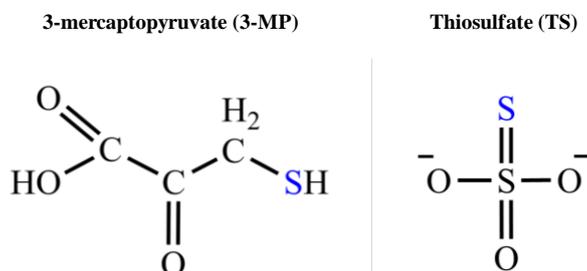


Figure 46. Structures chimiques du 3-MP et du TS.

La formation de l'intermédiaire persulfure implique donc la rupture de la liaison C-S dans le cas du 3-MP ou de la liaison S=S pour le TS mais les stratégies catalytiques ne sont pas clairement identifiées. Ceci est dû au fait qu'aucune étude cinétique dédiée à la caractérisation des différentes étapes du mécanisme, en particulier celle de formation du persulfure, avait été entreprise. Les seules propositions reposaient sur des analyses cinétiques à l'état stationnaire et/ou sur l'exploitation des structures cristallines des enzymes. Les méthodes cinétiques mises au point ont été utilisées pour caractériser le mécanisme catalytique des 3-MST et des TST, et les résultats obtenus ont permis de proposer un scénario en particulier pour la première étape de transfert de soufre.

I. Mécanisme catalytique des 3-MST

Le mécanisme des 3-MST humaine et d'*E. coli* a été étudié en présence de 3-MP comme substrat donneur et de Trx comme substrat accepteur de soufre. Plusieurs résidus conservés du site actif (Asp53, His66, Arg178, Arg187, Ser239) interviendraient dans la catalyse et/ou la reconnaissance des substrats (Figure 19, voir introduction page 33). De plus, nous avons émis l'hypothèse que l'Arg102 pouvait également être impliquée dans la catalyse de la première étape en ancrant la boucle catalytique CGSGVT (Figure 47). Une approche de mutagenèse dirigée couplée à la caractérisation des paramètres cinétiques de la première étape de transfert de soufre (k_{max1} et K_{3-MP}) a été utilisée pour préciser le rôle de chacun de ces résidus. Ces travaux sont présentés en détail dans la publication pages 78 à 110, et seul un résumé est donné ci-dessous.

Résultats

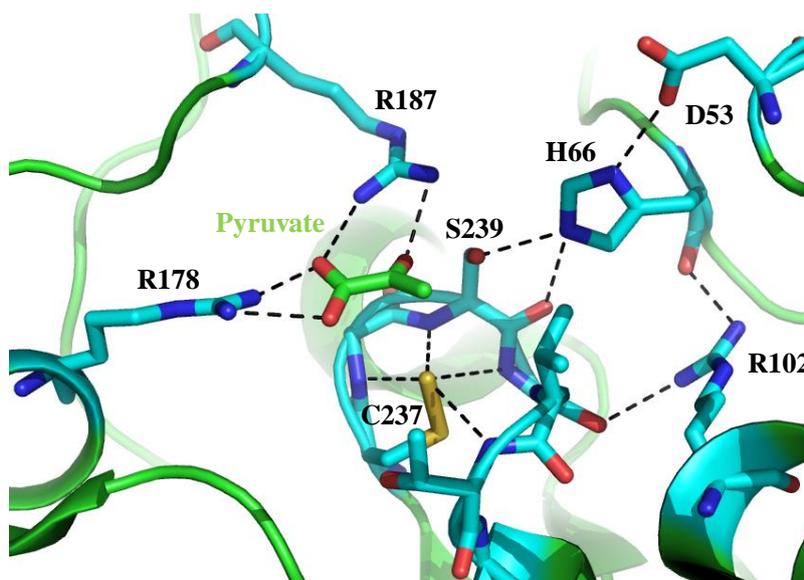


Figure 47. Site actif de la ^h3-MST sous forme intermédiaire persulfure en complexe avec le pyruvate (4JGT).

Cette figure a été générée par le logiciel PyMol (Shrödinger Inc.). Les résidus potentiellement impliqués dans la catalyse sont représentés en « boules et bâtons » selon le code couleur suivant : les atomes de soufres sont en jaune, les atomes de carbones en bleu cyan, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. Le pyruvate est représenté selon un code couleur différent : les atomes de carbone sont en vert.

Les résultats montrent que la première étape de transfert de soufre conduisant à la formation de pyruvate et de l'intermédiaire persulfure est très efficace pour les deux enzymes. La formation d'un complexe Michaelien compétent dépend de la stabilisation de la fonction carboxylate du substrat par le groupement guanidinium de l'Arg187, et du positionnement correct de l'atome de soufre du 3-MP par rapport à la Cys237 catalytique assuré par les interactions entre la chaîne latérale de l'Arg178 et les fonctions carboxylate et carbonyle (Figure 48 B), soit l'inverse des rôles assignés à ces résidus dans la littérature. Ensuite, la cystéine catalytique, déjà déprotonée dans l'enzyme libre (pK_{app} 5,2, Figure 48 A), réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre du substrat, lui-même sous forme thiolate (pK_{app} 5,9), conduisant à la formation de l'intermédiaire persulfure. Contrairement à ce qui était proposé à partir de données structurales, tout rôle de la triade Ser/His/Asp a pu être exclu. Par contre, nos résultats montrent clairement que la boucle catalytique CGSGVT joue un rôle central en tant que site de reconnaissance anionique favorisant la déprotonation des fonctions thiols et point d'ancrage permettant un positionnement adapté de la chaîne latérale de la Cys237 par rapport au 3-MP (Figure 48 B). Cette étape de transfert de soufre s'accompagne de la formation de pyruvate-énolate, qui doit être protoné pour permettre la libération de pyruvate. Des études d'effets isotopiques cinétiques de solvant et d'inventaire de protons ont montré que cette protonation implique une molécule d'eau et qu'elle est concomitante au transfert de soufre (Figure 48 B).

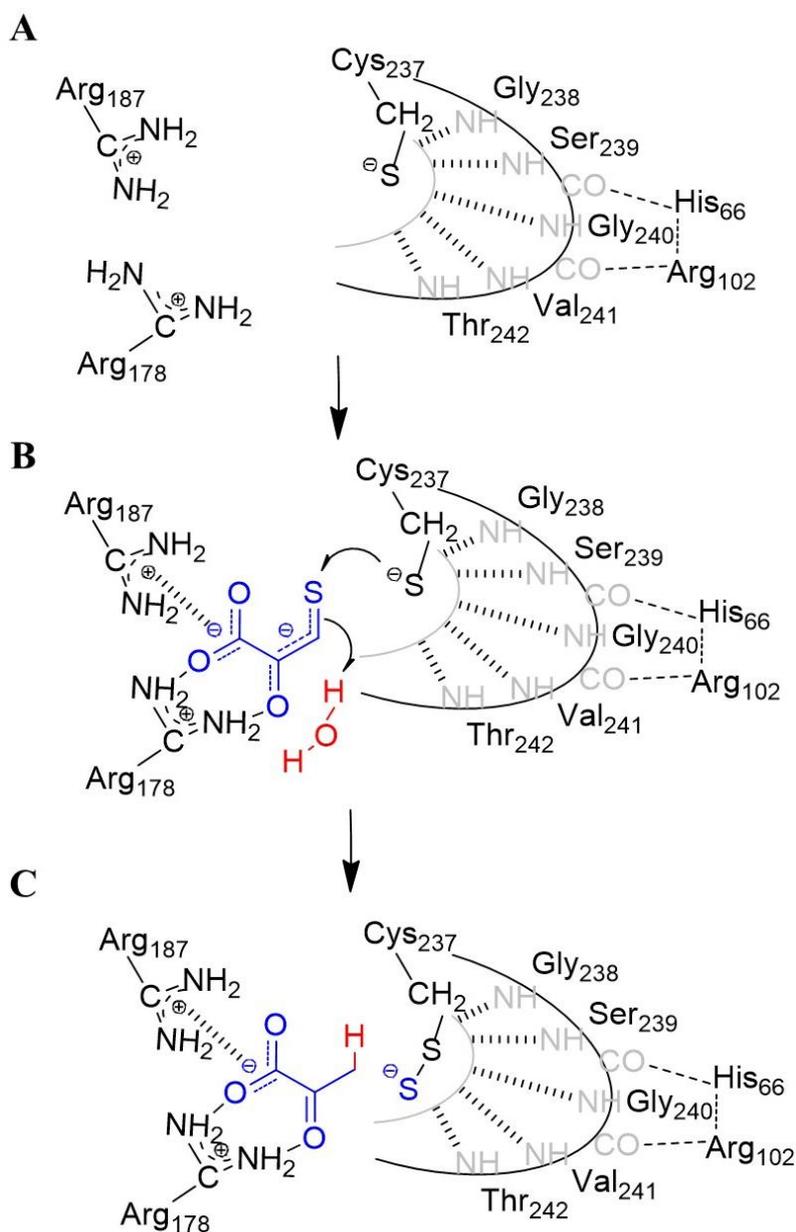


Figure 48. Mécanisme catalytique proposé pour les 3-MST.

Les acides aminés de la 3-MST sont représentés en noir et selon le code à 3 lettres, les fonctions amines tertiaire et cétone de la chaîne principale de la boucle catalytique sont représentés en gris et la numérotation utilisée correspond à celle de la ^{Ec}3-MST dont la méthionine en N-terminale a été enlevée. Le 3-MP est représenté en bleu et la molécule d'eau impliquée dans la protonation de l'énol-pyruvate est représentée en rouge. A : Enzyme libre ; B : Complexe Michaelien ; C : Complexe persulfure-pyruvate.

Publication

Jean-Christophe Lec, Séverine Boutserin, Hortense Mazon, Guillermo Mulliert, Sandrine Boschi-Muller, and François Talfournier (2018). Unraveling the mechanism of cysteine persulfide formation catalyzed by 3-MSTs. ACS catalysis, sous presse.

Unraveling the mechanism of cysteine persulfide formation catalyzed by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases

*Jean-Christophe Lec, † Séverine Boutserin, † Hortense Mazon, † Guillermo Mulliert, ‡
Sandrine Boschi-Muller, * † and François Talfournier* †*

† Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS-
Université de Lorraine, Bâtiment Biopole, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy,
54506, France.

‡ Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), UMR 7036 CNRS-
Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, 54506, France

KEYWORDS. H₂S signaling, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, persulfide, active site electrostatics, mechanism, kinetics, catalysis.

ABSTRACT

Sulfhydration of reactive cysteines in target proteins is now recognized as a major route by which H_2S mediates signal transduction and regulates various cellular processes. Among the enzymatic systems permitting the formation of cysteine persulfide from non-activated sulfur compounds, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases can be considered as a model of thiolate-based chemistry for carbon-sulfur bond breaking. These ubiquitous enzymes transfer a sulfur atom from 3-mercaptopyruvate (3-MP) to a thiol acceptor *via* a cysteine-persulfide intermediate, but the mechanistic basis for its formation is still unclear. To address this question, kinetic approaches were developed for studying the reaction catalyzed by the human and *Escherichia coli* enzymes and the role of several conserved residues was also investigated. We showed that the first step of sulfur transfer that leads to pyruvate release and formation of the persulfide intermediate is very efficient for both enzymes. It critically depends on the electrostatic contribution provided by the CGSGVT catalytic loop while any role of the so-called Ser/His/Asp triad can be excluded. Furthermore, solvent kinetic isotopic effect and proton inventory studies revealed a concerted mechanism in which the water-mediated protonation of the pyruvate enolate and the S^0 transfer from the deprotonated 3-MP to the thiolate form of the catalytic cysteine occurs concomitantly.

Résultats

INTRODUCTION

Over the past decade, increasing attention has been paid to persulfide (RSSH) chemistry due to the physiological functions ascribed to these entities, in particular in H₂S-mediated redox signaling. Formation of protein-bound persulfides is a posttranslational modification that is thought to be involved in signal transduction although the mechanism behind S-sulfhydration remains unclear.¹ The high reactivity of RSSHs make them good sulfur donors, and explain why reactive cysteine persulfides formed in proteins are proposed to be key actors in H₂S signaling pathways.²⁻⁶

In vivo, the formation of cysteine persulfides is achieved by two mechanisms. The first one consists in a reaction between an activated form of sulfur, H₂S (HS⁻ under physiological conditions), and an oxidized cysteine under disulfide or sulfenic acid form (Scheme 1).^{7,8} The second mechanism involves non-activated sulfur compounds and thus requires an enzymatic catalysis. If a carbon-sulfur bond must be broken this is mainly achieved by the cysteine desulfurases and the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases (3-MSTs) (Scheme 2).^{1,2,9,10} Cysteine desulfurases are pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes that catalyze the conversion of cysteine to alanine and sulfide *via* the formation of a reductively labile enzyme cysteinyl persulfide intermediate.^{11,12}

By contrast, the 3-MSTs do not require cofactors and these ubiquitous enzymes that are involved in H₂S production, belong to the rhodanese structural family.^{13,14} The rhodanese domain displays a typical α/β topology with a central five-stranded β -sheet flanked by four or five α -helices.^{15,16} In the X-ray structures available to date, the catalytic cysteine is mainly present at the persulfide state that is thought to be a key intermediate in the 3-MST-catalyzed reaction.^{17,18} The catalytic mechanism of 3-MSTs is assumed to occur *via* two successive steps. The reaction is initiated by the nucleophilic attack of the thiolate group of the catalytic cysteine on the sulfur atom of the donor substrate leading to formation of a persulfide intermediate on

the catalytic cysteine and product release (Scheme 3). This intermediate then undergoes a nucleophilic attack by an acceptor substrate. If the latter is a thiol compound, the decomposition of the product formed leads to H₂S production.^{14,18,19} Based on the X-ray structure of *Leishmania major* 3-MST, the mechanism of persulfide formation is proposed to involve a serine protease-like catalytic triad, where the Ser239 acts as a base catalyst to activate the catalytic Cys237 and contributes to the stabilization of the transition state¹⁷ (In this paper, the numbering of conserved amino acids refers to the *Escherichia coli* 3-MST (^{Ec}3-MST) sequence missing the N-terminal Met, Figure S1).¹⁸ Steady-state analyses performed on the R178G and R187G 3-MSTs from rat suggest that Arg178 must be important for the 3-mercaptopyruvate (3-MP) binding.²⁰ This statement is further supported by the structure of the human 3-MST (^h3-MST)/pyruvate complex, in which both Arg178 and Arg187 hydrogen-bonded the carboxylate of the pyruvate while Arg187 additionally interacted with the carbonyl function (Figure 1).¹⁸ Moreover, from the *E. coli* 3-MST structure, His66 and Arg102 are proposed to stabilize the 3-MP through hydrogen bond and electrostatic interaction, respectively.²¹ Finally, very recent theoretical studies using QM/MM methods argue for a mechanism of persulfide formation in which the sulfur atom transfer is initiated by the deprotonation of 3-MP.²² Nonetheless, it remains to be proven whether the cysteine persulfide intermediate is kinetically relevant to the 3-MST catalytic pathway and the molecular/mechanistic features responsible for its formation are still to be identified.

To address this gap in knowledge, we developed kinetic approaches for studying each step of the reaction catalyzed by two members of the 3-MST family (i.e. ^{Ec}3-MST and ^h3-MST) and defining the role of conserved residues in persulfide formation. Here, we propose a detailed catalytic mechanism that emphasizes the critical electrostatic contribution of the CGSGVT active site loop and the requirement for a water-mediated protonation of the enolate pyruvate to permit an efficient first step of sulfur transfer.

Résultats

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials – Commercial sodium salt of 3-MP (Santa Cruz Biotechnology) was further purified by reverse phase chromatography on a Delta-Pak C18 preparative column (19/300, Waters) coupled to an Aktä Explorer system (GE Healthcare) and equilibrated with 50 mM ammonium acetate buffer, pH 6.8. 3-MP was eluted isocratically before H₂S/HS⁻ and lyophilized before storage at -20°C. Lactate Dehydrogenase (LDH) and pyruvate were purchased from Sigma-Aldrich whereas NADPH and NADH were purchased from Roche. *E. coli* Trx1 and Trx reductase were prepared following experimental procedures already published.^{23,24} The *3mst* ORFs were amplified from genomic DNA of *E. coli* DH5 α , or sourced from BioScience lifeScience for the synthetic human *3mst* ORF.

Production and purification of ^h3-MST and ^{Ec}3-MST – The *3mst* ORF from *E. coli* was amplified by PCR and the resulting fragment was first ligated into pCR-Blunt II and then into the *Nde*I-*Sac*I site of pET20b(+) (Novagen), generating pET20-^{Ec}3MST. The synthetic human *3mst* ORF was ligated into the *Nde*I-*Sac*I site of pET28b(+) (Novagen), generating pET28-^h3MST. Site-directed mutageneses were performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strain C41 (DE3) or BL21 (DE3) for inducible expression of untagged ^{Ec}3-MST or N-terminal His-tagged ^h3-MST, respectively. Freshly grown overnight cultures of *E. coli* C41 (DE3) or BL21 (DE3) cells were used to inoculate LB supplemented with 200 mg/L ampicillin or 0.5 mg/L kanamycin for pET20- or pET28-plasmids, respectively. The cultures were incubated at 37 °C until A₆₀₀ reached 0.8 then 1 mM iso-propyl- β -D-thiogalactopyranoside was added. Following incubation at 20 °C for 18 h, the cells were harvested by centrifugation at 3000g for 20 min at 4 °C. At this stage, the cell pellets were used immediately for purification or washed with a buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 25% sucrose, pH 8.0) before storage at -20 °C.

For ^{h3}-MST purification, the cell pellets were suspended in A-Ni buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 40 mM imidazole, pH 8.0) containing 8 U/mL of Benzonase (Merck) and 4 mM MgSO₄, and sonicated. The supernatant was loaded onto a Ni NTA-agarose column equilibrated with A-Ni buffer using an Äkta Avant system (GE Healthcare). After being washed with equilibration buffer, the enzyme was eluted at 200 mM imidazole from a linear gradient ranging from 40 mM to 1 M in B-Ni buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1M imidazole, pH 8.0). Purified fractions were identified by 12.5% SDS-PAGE then pooled and dialyzed overnight against TE buffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0). For ^{Ec3}-MST purification, the cell pellets were suspended in TE buffer containing 8 U/mL of Benzonase (Merck) and 4 mM MgSO₄, and sonicated. The enzyme was then precipitated at 65% (NH₄)₂SO₄ saturation and after centrifugation the pellet was suspended in TE buffer containing 1 M (NH₄)₂SO₄. The enzymatic solution was applied onto a Phenyl-Sepharose column previously equilibrated with TE buffer containing 1 M (NH₄)₂SO₄ using an Äkta Avant system (GE Healthcare). After washing with equilibration buffer, the enzyme was eluted at 650 mM (NH₄)₂SO₄ using a descending gradient (1 to 0 M) of (NH₄)₂SO₄. Purified fractions were then pooled, diluted in TE buffer and applied to a Q-Sepharose column equilibrated with TE buffer. ^{Ec3}-MST was eluted at 600 mM KCl using a 0-1 M KCl gradient.

At this stage, all enzymes were purified to homogeneity as estimated by 12.5% SDS-PAGE. The yield was approximately 30 and 100 mg of ^{h3}-MST and ^{Ec3}-MST per liter of culture, respectively, and the molecular masses of 35210.4 ± 0.4 and 30680.6 ± 0.3 Da determined by mass spectrometry under denaturing conditions were in good agreement with the 35210.5 and 30680.6 Da predicted from the ^{h3}-MST and ^{Ec3}-MST sequence, respectively. Purified enzymes were stored at -20 °C in the presence of 10 mM DTT and 70% (NH₄)₂SO₄. Under these conditions, the enzymes were stable for several months. Enzyme concentrations were

Résultats

determined spectrophotometrically, using molar absorption coefficients at 280 nm of 51350 and 51907 M⁻¹.cm⁻¹ for ^h3-MST and ^{Ec}3-MST, respectively.

Steady-state kinetic studies – Steady-state kinetic parameters were determined at 30 °C in TE buffer with saturated or variable concentrations of 3-MP and *E. coli* Trx1 in the presence of a Trx-regenerating system (1.25 μM *E. coli* Trx reductase (TrxR) and 0.3 mM NADPH). The concentration of enzyme was 0.01 μM and 1 μM for the ^{Ec}3-MST and ^h3-MST, respectively, and initial rate measurements were carried out on a SAFAS UVmc² spectrophotometer by following the oxidation of NADPH at 340 nm. Data were fit to the Michaelis-Menten equation or the Hill equation using least-squares regression analysis (SigmaPlot 2000, Jandel Scientific) to determine k_{cat} , K_M or $K_{0.5}$ and Hill number (n) values with $k_{cat} = \frac{k_2.k_3.k_5.k_6}{k_3.k_5.k_6+k_2.k_5.k_6+k_2.k_3.k_6+k_2.k_3.k_5}$ (Scheme 4B).

Fluorescence properties of 3-MSTs – The fluorescence excitation and emission spectra of 3-MSTs in their reduced and persulfide states were recorded on a Xenius spectrofluorometer (SAFAS) equipped with a temperature controlled stirred cell. All measurements were performed at 30 °C using 10 μM of enzyme in TE buffer. The persulfide forms were obtained by mixing reduced 3-MSTs with a 5-fold excess of 3-MP during 5 minutes, followed by passing the solution through a PD Mini-Trap G-25 column (GE Healthcare). The excitation wavelength was set to 287 nm to record emission spectra from 300 to 400 nm, whereas the emission wavelength was set to 330 and 335 nm to obtain excitation spectra from 240 to 310 nm for ^h3-MST and ^{Ec}3-MST, respectively.

Single turn-over experiments – Except for quenched-flow experiments, all single turn-over studies were carried out on an SX19MV-R stopped flow apparatus (Applied PhotoPhysics), and collected data were analyzed using the SX19MV-R software package.

Determination of the rate of pyruvate formation – Rapid chemical quench experiments were carried out at 30 °C on a KinTek RFQ-3 instrument (KinTek Corporation). Under the conditions used, a minimum ageing time of about 2.5 ms was determined. Equal volumes of a solution containing 430 µM of 3-MST in TE buffer and a solution containing 4 mM 3-MP in TE buffer were mixed and allowed to react for 2.5 ms to 10 s before being quenched with an equal volume of an aqueous solution containing 9 % of perchloric acid. Quenched samples were collected and then analysed. After centrifugation, pyruvate quantification in the resulting supernatant was carried out by reverse phase chromatography: 100 µL were injected onto a 4.6 x 250 mm C18 column Atlantis (Waters) coupled to an Aktä Explorer system (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 2.0. Pyruvate was eluted isocratically before 3-MP and quantified by peak integration at 215 nm and using the calibration curve equation ($\text{Area} = 0.36 \times [\text{pyruvate}] + 6.42$) established with variable concentrations of pyruvate (25-500 µM). The concentration of pyruvate was plotted against time and fit to equation 1:

$$[\text{Pyruvate}] = A.(1-e^{-k_{\text{obs}}.t}) + b.t + c \quad (\text{Eq.1})$$

where A is the total concentration of pyruvate formed, k_{obs} is the observed rate constant, b is the slope of the linear phase, and c is the endpoint.

Kinetics of persulfide 3-MST formation – Kinetics of Trp fluorescence decrease associated with the formation of the persulfide 3-MST were measured at 30 °C. The excitation wavelength was set at 295 nm and the emitted light was detected using a 320 nm cut-off filter. One syringe was filled with 3-MST in TE buffer (10 µM final concentration after mixing) and the other contained 3-MP at various concentrations. An average of at least five runs was recorded for each substrate concentration and collected data were fit to a biphasic expression (single

Résultats

exponential + slope) where the first kinetic phase represents the fast decrease in fluorescence accompanying the reduced-persulfide transition. The resulting k_{obs} data were fit to equation 2 to determine k_{max1} and $K_{3\text{-MP}}$, the apparent affinity constant for 3-MP.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{max1}} \cdot [\text{S}] / (K_{3\text{-MP}} + [\text{S}]) \quad (\text{Eq.2})$$

with $k_{\text{max1}} = k_2$ and $K_{3\text{-MP}} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ (Scheme 4B).

For wild-type and H66A^{h3}-MSTs, the pH dependence of the rate constant k_{max1} was studied at 30 °C over a pH range 4.0–10.0 in polybuffer A containing 30 mM acetic acid, 30 mM imidazole, 120 mM Tris/HCl at constant ionic strength of 0.15 M in the presence of a saturating concentration of 3-MP. k_{max1} values were plotted against pH and fit to equation 3, deriving from a one-pKa model, where k_{lim} represent the maximum pH-independent rate constant.

$$k_{\text{max1}} = \frac{k_{\text{lim}}}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} \quad (\text{Eq.3})$$

Kinetics of sulfur transfer from the persulfide 3-MST to Trx – Kinetics of sulfur transfer from the persulfide 3-MST to Trx were measured at 30°C with the Trx-regenerating system by following the oxidation of NADPH at 340 nm. Persulfide 3-MST was pre-formed as described in the paragraph *Fluorescence properties of 3-MSTs*. One syringe contained persulfide 3-MST (1-10 μM) and TrxR (37.5 μM) in TE buffer and the other one contained NADPH (0.3 mM) and Trx at various concentrations in TE buffer. To eliminate the background due to the NADPH oxidase activity of TrxR, control experiments were done under the same experimental conditions but in the absence of 3-MST, and the resulting transients were subtracted from those obtained in the presence of persulfide 3-MST. An average of at least five runs was recorded for each substrate concentration and the progress curves were fit to double exponential expression: the first kinetic phase represents the reduction of disulfide Trx by TrxR, whereas the second reflects a side-reaction between TrxR and HS⁻ generated concomitantly to disulfide Trx. Rate constants k_{obs} were obtained by fitting fluorescence traces to a double exponential expression

and these data were fit to equation 4 to determine $k_{\max 2}$ and K_{Trx} , the apparent affinity constant for Trx.

$$k_{\text{obs}} = k_{\max 2} \cdot [\text{S}] / (K_{\text{Trx}} + [\text{S}]) \quad (\text{Eq.4})$$

with $k_{\max 2} = k_5$ and $K_{\text{Trx}} = \frac{k_4 + k_5}{k_4}$ (Scheme 4B).

Determination of dissociation rate constant for pyruvate – The rate of pyruvate dissociation from the persulfide 3-MST/pyruvate binary complex was measured at 30 °C using the coupled pyruvate/LDH assay as a pyruvate-trapping system. One syringe was filled with 1.25 μM LDH and 300 μM NADH in TE buffer and the other contained 5 μM pyruvate and 2.5 μM persulfide 3-MST (or not for the control experiment), in TE buffer. Data were fit to a biphasic expression.

Measurement of the thiol ionization by ultraviolet absorbance – Absorbance spectra were measured for all enzymes in 1.0-cm path-length quartz cuvettes in a SAFAS UVm² spectrophotometer. The proteins samples were diluted in polybuffer A and spectra were recorded at 30 °C in 0.5-nm steps from 200 nm to 300 nm. The buffer solution was scanned relative to air, followed by a protein solution in the same cuvette versus air. The two spectra were then subtracted and the difference converted to molar absorption coefficients at 240 nm ($\epsilon_{240 \text{ nm}}$). Data were fit to a one-pKa model,

$$\epsilon_{240 \text{ nm}} = \epsilon_{\text{SH}} + \frac{\epsilon_{\text{S}^-} - \epsilon_{\text{SH}}}{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}} \quad (\text{Eq.5})$$

where ϵ_{SH} and ϵ_{S^-} are the molar absorption coefficients of the thiol and the thiolate species, respectively.

Solvent kinetic isotope effect and proton inventory experiments – The ^h3-MST and the 50 mM Tris buffer were lyophilized and redissolved in D₂O and the 3-MP was freshly prepared in D₂O. The pD of the reconstituted D₂O buffer was checked with a conventional glass electrode and

Résultats

the observed pH reading was corrected using the relationship $pD = \text{observed pH-meter reading} + 0.4$.²⁵ The k_{max1} values were determined under single turn-over conditions at saturating 3-MP concentration (1 mM) and pL 8.0 (L= H or D). The solvent kinetic isotope effect (SKIE) was given by the ratio of the rate constant k_{max1} obtained in pure H₂O (k_0) and that obtained in D₂O ($k_{\text{D}_2\text{O}}$). For proton inventory, the fraction of D₂O was varied from 0 to 100 % (i.e. $0 \leq n \leq 1$). In each case, k_{max1} values were determined under similar conditions to that described above. Data were analyzed by plotting the ratio of the rate constant k_n obtained at a particular D₂O fraction (n), and the rate constant k_0 obtained in pure H₂O versus n. The points were fit to the simplified Gross-Butler equation:²⁵

$$k_n/k_0 = 1-n + n \cdot \Phi^T \quad (\text{Eq.6})$$

where Φ^T is the inverse SKIE.

RESULTS / DISCUSSION

Steady-state kinetics for the wild-type 3-MSTs –The steady-state kinetic parameters were determined in the presence of 3-MP and Trx as donor and acceptor substrates, respectively, using TrxR and NADPH as a coupled assay. Although both enzymes displayed similar K_M values, the k_{cat} was 238-fold higher for ^{Ec}3-MST (Table 1). Moreover, as previously reported by Banerjee and coll.,¹⁸ ^{h3}3-MST exhibited kinetic cooperativity with respect to 3-MP and Trx. This behavior that may result from hysteresis^{18,26,27} cannot be adequately described by a “classical” ping-pong mechanism (scheme 4B black parts). One possible explanation is the requirement for conformational transitions to occur between the two steps of sulfur transfer (scheme 4B grey parts), with E and E* two conformations of the enzyme that are in equilibrium and catalytically competent for the first and the second step, respectively. Kinetic cooperativity would thus result from $E_1^* \rightleftharpoons E_1$ and $E_2 \rightleftharpoons E_2^*$ transitions not rapid enough to be at equilibrium

during catalysis (i.e. with rate-constants comparable to k_{cat}). One can postulate that our proposed kinetic scheme is also valid for the E_c 3-MST-catalyzed reaction but, in this case, the $E_1^* \rightleftharpoons E_1$ and $E_2 \rightleftharpoons E_2^*$ transitions are likely much faster than the catalytic cycle so that no kinetic cooperativity is revealed. Interestingly, under single turn-over conditions (see next parts), the absence of lag phase in the transient kinetics obtained for each step of sulfur transfer suggests that the E and E* conformations are thermodynamically favored for the thiol and the persulfide form of the enzyme, respectively. Therefore, these additional $E \rightleftharpoons E^*$ interconversion processes (scheme 4B grey parts) are no more relevant and the associated microscopic rate-constants can be ignored in the expression of the transient parameters K_{3-MP} and K_{Trx} . While the complete characterization of the reaction pathway is beyond the scope of the current study, this has to be pointed out because it could explain why the values of k_{max1}/K_{3-MP} and k_{cat}/K_M (or $k_{cat}/K_{0.5}$) that are expected to be similar for a ping-pong mechanism differ by several orders of magnitude (Table 1).

Because steady-state kinetics were not appropriate to investigate the catalytic mechanism of 3-MSTs and to elucidate the role of several conserved residues, in particular those of the so-called Ser-His-Asp triad in the first step of sulfur transfer, we developed experimental approaches to perform detailed kinetic studies on each step.

The formation of the persulfide intermediate is very rapid for wild-type 3-MSTs – As previously mentioned, the proposed mechanism for the 3-MSTs-catalyzed reaction is thought to proceed through the formation of a persulfide intermediate on the catalytic cysteine residue.¹⁸ In that case, accumulation of this intermediate and concomitant formation of pyruvate should occur in the absence of acceptor substrate. This assumption was strongly supported by ESI-MS measurements performed on E_c 3-MST before, and after incubation with 2 mM 3-MP under single turn-over conditions (i.e. without acceptor substrate), which revealed a 32 Da increase in

Résultats

the molecular mass of the enzyme upon 3-MP treatment (Figure S2). This also emphasized the stability of the persulfide intermediate within the 3-MSTs active site that could originate from several hydrogen bonds between the distal sulfur atom of the cysteinyl persulfide and neighbouring peptidic NH groups (Figure 1)¹⁸. Although our experimental data agreed well with the proposed two-step chemical mechanism (Scheme 3) it remained to be established whether the formation of a cysteine persulfide intermediate was kinetically relevant. To determine the rate constant associated with the formation of the persulfide intermediate, one possibility was to follow the concomitant formation of pyruvate. At various times of incubation of 3-MST with 2 mM 3-MP, in the absence of acceptor substrate, the reaction mixture was quenched with perchloric acid. Pyruvate was then quantified by reverse-phase chromatography analysis and a burst of pyruvate production was observed (data not shown). Unfortunately, the rate constant was too high, at least 1000 s^{-1} , to be accurately determined with the quenched-flow apparatus, which gave a minimum aging time of 2.5 ms. Therefore, we took advantage of the 40 % decrease in the fluorescence emission intensity of 3-MSTs upon going from the reduced to the persulfide forms (Figure S3). Following selective excitation of Trp residues at 295 nm, the change in fluorescence emission of 3-MSTs was thus measured under single turnover conditions using a stopped-flow apparatus.

Irrespective of the 3-MP concentration, a fast decrease in the fluorescence emission signal was observed for both enzymes. Interestingly, this decrease was no longer detected in W10A^{Ec}3-MST (data not shown), suggesting that invariant Trp-10 was a good probe to sense a change in the active site environment along the sulfur transfer process. Moreover, the fact that the rate-constants associated with the persulfide or the pyruvate formation were shown to be similar for H66A^{Ec}3-MST (i.e. $21.9 \pm 0.1\text{ s}^{-1}$ vs $15 \pm 1\text{ s}^{-1}$ in the presence of 2 mM 3-MP, Figure 2A and 2B) further confirmed that monitoring the fluorescence change was an appropriate method for investigating the kinetics of the first step of sulfur transfer (step a scheme 4). Fast kinetic

experiments were then carried out at pH 8 under single turn-over conditions in the absence of Trx. Saturation kinetics were obtained with respect to 3-MP and $K_{3\text{-MP}}$ values of 160 ± 30 and $110 \pm 10 \mu\text{M}$ and k_{max1} values of 1520 ± 90 and $290 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ were determined for $^{\text{Ec}}3\text{-MST}$ and $^{\text{h}}3\text{-MST}$, respectively (Figure 2C and 2D). These data indicated that the formation of the persulfide intermediate is rapid and not rate-limiting with k_{max1} values 13- and 617-fold higher than the k_{cat} values (Table 1). Therefore, the rate-limiting step of the reaction follows the persulfide intermediate/pyruvate complex formation and could be associated with pyruvate release or the second step of sulfur transfer (Scheme 4).

The pyruvate dissociation is rate-limiting – The rate constant of pyruvate dissociation (k_{off}) from the persulfide intermediate/pyruvate complex (step b scheme 4) was determined using LDH as a pyruvate-trapping system. The experiments were performed using $^{\text{h}}3\text{-MST}$ at pH 8 under single turn-over conditions in the absence of Trx. The resulting progress curves were fit to a biphasic expression: the first kinetic phase represents the reduction of unbound pyruvate, whereas the second corresponds to the titration of pyruvate that dissociates from the persulfide intermediate/pyruvate complex (Figure 3A, lower trace). Under the experimental conditions used, an apparent rate constant k_{off} of 0.56 s^{-1} was determined for the pyruvate release from the binary complex. Because k_{off} and k_{cat} values are similar (0.56 s^{-1} vs 0.47 s^{-1}), the rate-limiting step of the $^{\text{h}}3\text{-MST}$ -catalyzed reaction is associated with the pyruvate dissociation. Although it can be postulated that the same is true for $^{\text{Ec}}3\text{-MST}$, this could not be validated experimentally. Indeed, the rate constant of 1.52 s^{-1} determined for pyruvate reduction by LDH (Figure 3A, upper trace) was approx. 70-fold lower than the rate constant associated with the pyruvate release that must be at least equal to 112 s^{-1} (i.e. the k_{cat} value for $^{\text{Ec}}3\text{-MST}$) thus preventing the determination of the k_{off} value. However, an indirect validation rested on the determination of the rate constant associated with the second step of sulfur transfer.

Résultats

In the presence of Trx as acceptor substrate, the sulfur transfer from the persulfide intermediate to Trx leads to reduction of 3-MST and to formation of a persulfide intermediate on the nucleophilic Cys32 from Trx, which rapidly evolves to generate the disulfide Trx and H₂S.¹⁴ Therefore, a convenient method to study the second step of sulfur transfer was to follow, under single turn-over conditions, the fluorescence increase associated with the persulfide-reduced transition undergone by 3-MSTs upon sulfur transfer to Trx. Unexpectedly, no fluorescence change was observed showing that the magnitudes of the fluorescence increase for 3-MSTs reduction and fluorescence decrease for Trx oxidation were likely equal.²⁸ An alternative was to use the NADPH/Trx reductase as reporting system. However, one needs to bear in mind that such kinetics do not only reflect the second step of sulfur transfer but also the concomitant formation of disulfide Trx and H₂S (step c scheme 4). Under the experimental conditions used, the rate constant for Trx reduction was 5-fold lower than the k_{cat} value determined for the ^{Ec}3-MST-catalyzed reaction (i.e. approx. 20 s⁻¹ vs 112 s⁻¹, data not shown), thus precluding the use of this coupled assay for studying the kinetics of the bacterial enzyme. Fortunately, the picture differed for the human enzyme and experiments performed in the presence of 1-10 μM persulfide ^h3-MST and 10-250 μM Trx, yielded an apparent affinity constant K_{Trx} of 24 ± 5 μM and a rate constant k_{max2} of 2.3 ± 0.2 s⁻¹ which was 5-fold higher than the k_{cat} (Figure 3B). Together, our data showed that the two steps of sulfur transfer are catalytically efficient for both enzymes with rate constants (k_{max1} and k_{max2}) ranging from 2.3 s⁻¹ to 1520 s⁻¹ (Table 1) and that H₂S formation is fast as well. Moreover, pyruvate dissociation is shown to be rate-limiting, at least for the human enzyme, but is at least 200-fold faster for ^{Ec}3-MST. Although this remains to be explained at the molecular level, it may reveal significant differences in structural dynamics associated with catalysis between the human and the bacterial enzymes, such as the increased flexibility of the 61-67 and 181-198 regions in ^{Ec}3-MST that may strongly favor the release of pyruvate.²¹

Effects of the Arg178L and Arg187L substitutions – The kinetic parameters determined at pH 8.0 are summarized in Table 1. Substituting Leu for each or both Arg residues resulted in a 4- to 15-fold increase in K_M for 3-MP and a 700- to 2200-fold decrease in k_{cat} . Although these drastic effects highlighted the critical role of both Arg178 and Arg187 residues in the 3-MST-catalyzed reaction, comparison of the k_{max1} and K_{3-MP} constants determined under single turnover conditions for the wild-type and the mutated 3-MSTs were expected to furnish additional insights into their role(s) in the first step of sulfur transfer. Interestingly, the 45- to 413-fold decrease in the k_{max1}/K_{3-MP} value reflects either a 72-fold decrease in k_{max1} or a 94-fold increase in K_{3-MP} for the R178L or the R187L 3-MSTs, respectively. Therefore, the role we can assign to each Arg differs to what was proposed by Yadav *et al.*, with a stabilization of the 3-MP binding ensured by the Arg187 side-chain through an interaction between the guanidinium group and the C3-carboxylate, while the Arg178 side-chain interacts with the C3-carboxylate and the C2-carbonyl functions to permit an efficient positioning of the 3-MP with respect to the catalytic Cys237. Our interpretation is strongly supported by the fact that the authors clearly indicate that the positions of the carboxyl and carbonyl groups in 3-MP or pyruvate are indistinguishable in the ^h3-MST crystalline binary complex.¹⁸ As shown by the “moderate” decrease in k_{max1}/K_{3-MP} , the first step of sulfur transfer is not drastically impaired for both R178L and R187L 3-MSTs suggesting that the remaining Arg residue may compensate the absence of the other one. One can also postulate that additional contributions are likely to be critical for the catalytic efficiency of the first step because substituting both Arg does not fully abolish the sulfur transfer (Table 1, k_{max1}/K_{3-MP} 3800-fold lower for R178L/R187L 3-MST). Finally, the rate-limiting step remains associated with the pyruvate release irrespective of the mutated Arg, with k_{off} values of 0.04 and 0.07 s⁻¹ for R178L and R187L 3-MSTs, respectively (curves not shown). This result is rather in agreement with our hypothesis regarding the role of the increased flexibility of the 181-198 loop in favoring the pyruvate release in ^{Ec}3-MST. Whether these

Résultats

substitutions restrict the mobility of this loop or modify its conformation remains to be evaluated, and in this respect, molecular dynamics experiments are expected to be informative.

The Ser/His/Asp triad is not directly involved in catalysis – As shown in Table 1, substituting Ala for Ser239 in ^{Ec}3-MST led to a 45-fold decrease in k_{cat} , a 4-fold increase in $K_{3\text{-MP}}$ but had no significant impact on k_{max1} value. Therefore, any key role of the Ser hydroxyl group in the persulfide formation can be excluded, in contrast to what was proposed in other studies.^{17,18} This statement is further supported by the fact that the same substitution in the human enzyme is even more neutral with a 3-fold decrease in k_{cat} , no change in k_{max1} and an 8-fold increase in $K_{3\text{-MP}}$. Regarding the role of the His residue of the triad, substituting Ala for His66 in ^{Ec}3-MST did not significantly change the steady-state kinetic parameters with a 5.5-fold decrease in k_{cat} , but the first step of sulfur transfer became rate-limiting with a k_{max1} value 60-fold lower (Table 1). As expected, introducing at this position an Asn residue, that may restore the H-bond network established between the residues of the triad, increased the catalytic efficiency up to the wild-type level. Nevertheless, this network cannot be considered as essential for the formation of the persulfide because its loss only led to a 40-fold decrease in the $k_{\text{max1}}/K_{3\text{-MP}}$ ratio. This hypothesis is strongly supported by the results obtained on the H66A ^h3-MST with a moderate 10-fold decrease in $k_{\text{max1}}/K_{3\text{-MP}}$ ratio relative to the wild type and a rate-limiting step that remains associated to a process that follows the first step of sulfur transfer. However, the more obvious consequence of this substitution is the disappearance of the hysteric behavior observed for the wild type under steady-state conditions. The substitution of Asp53, the last conserved residue of the triad, into Ala did not change the kinetic parameters of ^{Ec}3-MST for the first step. This residue is thus not essential for the 3-MST-catalyzed persulfide formation. Finally, regardless of the 3-MST X-ray structures, the guanidinium group of invariant Arg102 appears to be H-bonded to the carbonyl functions of His66 and Gly240 (Figure 1). We thus

hypothesized that Arg102 was indirectly involved in the catalysis of the first step by anchoring the loop that contains the catalytic Cys237. As shown in Table 1, the $k_{\max 1}/K_{3\text{-MP}}$ ratio was 71- and 18-fold decreased for the R102L and R102K ^{Ec}3-MSTs, respectively, and for both enzymes the first step of sulfur transfer becomes rate-limiting as already observed for the H66A ^{Ec}3-MST. These results are rather consistent with our proposal because a bidentate interaction would account for the similar effects of both mutations on the catalysis. Additional support is also provided by the results obtained on the H66A/R102L ^{Ec}3-MST that revealed a cumulative effect of the substitutions with a 170-fold decrease in the $k_{\max 1}/K_{3\text{-MP}}$ ratio that originates from a significant decrease in $k_{\max 1}$. Altogether this delineate a pattern of H-bond interactions that seems to be critical for stabilizing a conformation of the catalytic loop that is required for an efficient first step of sulfur transfer.

The persulfide formation is mainly driven by electrostatic contributions provided by the catalytic loop – Another key question that needs to be addressed regarding the catalytic efficiency of the first step of sulfur transfer is the requirement for the Cys237 and the 3-MP thiol groups to be deprotonated. As we proposed a role for the peptidic NH groups of the so-called catalytic loop (CGSGVT loop, Figure 1) in the stabilization of the persulfide intermediate, they were also expected to lower the pK_{app} values of both –SH groups for increasing their chemical reactivity at neutral pH. Therefore, a disruption of the H-bond network that anchors this loop (see previous paragraph) was likely to modify the ionization state of both thiol groups, in particular that of the substrate. Because $k_{\max 1}$ values remained in the same range (25 to 52 s⁻¹) irrespective of the substitutions made (H66A and R102L/K for ^{Ec}3-MST or H66A ^h3-MST), we thus decided to perform pH-dependence studies on one of those mutants in addition to the wild type. Due to experimental reasons (see below), pH-dependence studies were carried out on the wild-type and H66A ^h3-MSTs. The ionization of the catalytic –

Résultats

SH group was selectively monitored on the free ^{h3}-MST by the detection of the thiolate absorbance at around 240 nm (see e.g. ²⁹). To avoid any additional contribution of the polypeptidic chain in this wavelength region, the C237A or the C237A H66A mutant was used as internal reference for the wild-type or the H66A ^{h3}-MST, respectively. The pH/absorbance curves exhibited a monosigmoidal profile with pK_{app} values of 5.2 ± 0.1 and 6.1 ± 0.1 for the wild-type and the H66A ^{h3}-MSTs, respectively (Figure 4A). Thus, the moderate 0.9 unit-increase in the pK_{app} of the catalytic Cys shows that no significant change occurs around this residue upon substituting an alanine for His66, as supported by similar ϵ_S - values (ie $6180 \pm 160 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ vs $6280 \pm 100 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). In an attempt to titrate the thiol group of 3-MP, the pH-dependence of the rate-constant associated with the first step of sulfur transfer was determined for the wild-type and H66A ^{h3}-MSTs, over a pH range of 4.5-10 and at 1 mM 3-MP, a saturating concentration for both enzymes ($K_{3-MP} \sim 100 \mu\text{M}$). Unexpectedly, k_{max1} values at pH 7.9 were approx. 3-fold higher than those determined in the presence of 50 mM Tris (see Table 1) for the wild-type and the H66A ^{h3}-MSTs, respectively. A similar stimulating effect due to the higher ionic strength of the polybuffer was observed for the bacterial enzyme, leading to rate-constant values predicted to be higher than 4500 s^{-1} at pH 8.0 for the wild-type ^{Ec}3-MST, and so above the technical limits of a stopped-flow apparatus. This explains why all pH-dependence studies were done on the human enzymes. The resulting pH- k_{max1} curves exhibited sigmoidal profiles that were related to the contribution of one ionizable group of pK_{app} 5.9 ± 0.1 or 8.3 ± 0.1 for the wild-type or the H66A ^{h3}-MST, respectively (Figure 4B). To assign the pK_{app} values one ought to consider whether they relate to the enzyme or the substrate because the pH-dependence of k_{max1} refers to the enzyme-substrate complex. In this pH range, the contribution of the carboxyl group of the substrate can be excluded as both Arg178 and Arg187 are likely to decrease its pK_{app} to a value much lower than 4.5. Therefore, the pK_{app} s 5.9 and 8.3 are due to ionization of the thiol group of either the catalytic Cys237 or the 3-MP. Several lines of

evidence argue for an assignment to the thiol group of the substrate. The closed k_{lim} values determined at optimal pH (ie $385 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ vs $830 \pm 20 \text{ s}^{-1}$, Figure 4B) indicate that, in the H66A ^{h3}-MST, the catalytic Cys237 and the 3-MP remain positioned such that an efficient sulfur transfer occurs towards the Cys237. As 3-MP is strongly anchored within the active site through stabilizing interactions with Arg178 and Arg187, the orientation of Cys237 relative to 3-MP is not modified, as well. Likewise, no drastic increase in the pK_{app} of Cys237 should be observed because the substitution H66A is expected to have the same impact on the conformation of the catalytic loop in the free and the complex forms. It was thus reasonable to assign the pK_{app} of 5.9 or 8.3 to the 3-MP thiol group. The strong decrease in its chemical reactivity at neutral pH suggests that substituting an Ala for His66 induces a movement of the catalytic loop that nearly abolishes the electrostatic contribution of the peptidic NH-groups in stabilizing the thiolate form and one can assume that the same is true when substituting Arg102. Altogether, this led us to propose a mechanism whereby the persulfide formation is mainly driven by electrostatic contributions provided by the catalytic loop (Scheme 5). The interactions Arg178/C₂-C₃ and Arg187/C₃ permit an efficient positioning of the 3-MP with respect to the catalytic Cys237 that is already fully activated in the resting state. However, the nucleophilic attack undergone by the 3-MP thiol group critically depends on its deprotonation, which is favored by the electrostatic environment provided by the catalytic loop. Although this proposal agrees well with that based on QM/MM studies performed on the human enzyme,²² a major difference emerges regarding the role ascribed to Ser239. Indeed, any key role of this residue in the activation of the 3-MP thiol group and thus in the sulfur transfer step can be ruled out, as clearly shown by our kinetic data (Table 1). Moreover, the fact that similar values of k_{max1} were obtained at pH 6.0 and pH 8.0 for the wild-type and the S239A ^{h3}-MSTs (data not shown) proves that no significant shift in the pK_{app} of the 3-MP thiol group occurs upon substituting Ser239, thus providing additional support to our statement.

Résultats

A water molecule is required to protonate the pyruvate enolate – To further decipher the mechanism whereby 3-MSTs catalyze the first step of the reaction, it was necessary to determine the way by which the methylene group of the enolate tautomer of pyruvate is protonated. Interestingly, the mutated H66N^{Ec}3-MST exhibits kinetic properties identical to those of the wild type. Because an Asn side-chain is unable to abstract or donate protons, a proton relay involving the residues depicted to be part of the Ser/His/Asp triad can be excluded, in contrast to what was proposed in the literature.^{17,18,22} It was thus reasonable to postulate that a water molecule was associated with this proton transfer process. To address this issue, SKIE were measured on the first step of sulfur transfer at pL 8.0 and substituting D₂O for H₂O resulted in a 2.2- and 2.5-fold decrease in $k_{\max 1}$ for the bacterial and the human enzyme, respectively. The contribution of solvent-derived protons was further analyzed by performing proton inventory experiments for the wild-type ^h3-MST at pL 8.0. The normalized $k_{\max 1}$ (k_n/k_0) was plotted versus the D₂O mole fraction (n) and the data were fit to equation 6 (Figure 5) yielding a fractionation factor Φ^T of 0.44 ± 0.05 . The linearity of the plot accounts for a single solvent-derived proton in the rate-determining transition state and considering that $k_{\max 1}$ values were obtained by monitoring the fluorescence changes upon going from the reduced to the persulfide forms, the protonation of the pyruvate enolate is thus concomitant to the persulfide formation. Therefore, and although it was excluded from the QM/MM studies,²² our results suggest that a water molecule of the active site is the direct proton donor to pyruvate enolate as also proposed for the reactions catalyzed by pyruvate kinase and pyruvate class II aldolase.^{30,31} Based on the crystal structure of the ^h3-MST that includes the pyruvate substrate (PDB code: 4JGT), the best candidate seems to be the water W1 which could be held in position through an H-bond network involving the Thr242 side-chain.

CONCLUSION

Our work provides significant insights on 3-MSTs catalysis and more specifically emphasizes the critical role of active site electrostatics in the formation of reactive cysteine persulfides. Through the contribution of its peptidic NH groups, the CGSGVT catalytic loop acts as a “thiolate hole” favoring the deprotonation of the 3-MP and Cys237 thiol groups required for a S^0 transfer. In addition, the Arg178 and Arg187 guanidinium groups permit a productive binding of the substrate and further polarize the C-S bond, and the His66 and Arg102 side-chains anchors the catalytic loop through an H-bond network. Altogether, this delineates a pattern of interactions that permits a very efficient sulfur transfer between the substrate 3-MP and the catalytic Cys237. Furthermore, the water-mediated protonation of the pyruvate enolate is shown to be rate-determining for the S^0 transfer and thus occurs concomitantly to the cysteine persulfide formation. In conclusion, the thiolate-based chemistry used by 3-MSTs is highly dependent on the CGSGVT catalytic loop and the critical role played by an active site loop seems to be a mechanistic feature common to other members of the rhodanese structural family, as already demonstrated for the so-called P-loop of the eukaryotic arsenate reductases and protein tyrosine phosphatases.^{32,33}

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Informations

S1- ^{Ec}3-MST and ^h3-MST sequence alignment and secondary structure comparison.

S2- ^{Ec}3-MST mass spectrometry analyses.

Résultats

S3-^{Ec}3-MST and ^h3-MST fluorescence spectra.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

* E-mail: sandrine.boschi@univ-lorraine.fr (S.B.M.), francois.talfournier@univ-lorraine.fr (F.T.)

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Région Lorraine and supported by the CNRS, the University of Lorraine and the Fédération de Recherche 3209 “Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique”. J.C.L. was supported by the French Research Ministry. Mass spectrometry was performed at the “Service commun de spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques couplées” from the University of Lorraine.

ABBREVIATIONS

3-MST, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; ^h3-MST, human 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; ^{Ec}3-MST, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase from *E. coli*; 3-MP, 3-mercaptopyruvate; Trx, thioredoxin; TrxR, thioredoxin reductase; LDH, lactate dehydrogenase; SKIE, solvent kinetic isotope effect.

REFERENCES

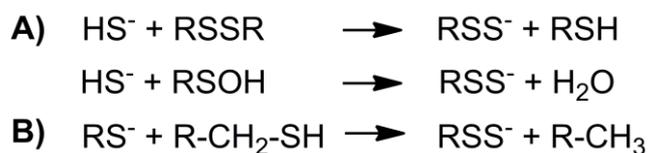
- (1) Mishanina, T. V.; Yadav, P. K.; Ballou, D. P.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 25072-80.
- (2) Mueller, E. G. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 185-194.

- (3) Park, C. M.; Weerasinghe, L.; Day, J. J.; Fukuto, J. M.; Xian, M. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1775-85.
- (4) Yadav, P. K.; Martinov, M.; Vitvitsky, V.; Seravalli, J.; Wedmann, R.; Filipovic, M. R.; Banerjee, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 289-99.
- (5) Toohey, J. I. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 1-7.
- (6) Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N. O.; Xian, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 7606-11.
- (7) Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Coitino, E. L.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M. R.; Alvarez, B. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 26866-26880.
- (8) Cuevasanta, E.; Möller, M. N.; Alvarez, B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 9-25.
- (9) Hansen, R. E.; Roth, D.; Winther, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 422-7.
- (10) Vasas, A.; Dóka, É.; Fábrián, I.; Nagy, P. *Nitric Oxide* **2015**, *46*, 93-101.
- (11) Kessler, D. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 825-840.
- (12) Cavuzic, M.; Liu, Y. *Biomolecules* **2017**, *7*, E27.
- (13) Zheng, L.; White, R. H.; Cash, V. L.; Jack, R. F.; Dean, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2754-8.
- (14) Zheng, L.; White, R. H.; Cash, V. L.; Dean, D. R. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4714-20.
- (15) Colnaghi, R.; Cassinelli, G.; Drummond, M.; Forlani, F.; Pagani, S. *FEBS Lett.* **2001**, *500*, 153-6.
- (16) Westrop, G. D.; Georg, I.; Coombs, G. H. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33485-33494.
- (17) Bordo, D.; Bork, P. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 741-6.
- (18) Cipollone, R.; Ascenzi, P.; Visca, P. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 51-9.
- (19) Alphey, M. S.; Williams, R. A.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Hunter, W. N. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48219-27.
- (20) Yadav, P. K.; Yamada, K.; Chiku, T.; Koutmos, M.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20002-20013.
- (21) Mikami, Y.; Shibuya, N.; Kimura, Y.; Nagahara, N.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. *Biochem. J.* **2011**, *439*, 479-485.
- (22) Nagahara, N.; Nishino, T. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27395-401.
- (23) Spallarossa, A.; Forlani, F.; Carpen, A.; Armirotti, A.; Pagani, S.; Bolognesi, M.; Bordo, D. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 583-93.
- (24) Huang, G. T.; Yu, J. S. K. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4608-4615.
- (25) Mössner, E.; Huber-Wunderlich, M.; Glockshuber, R. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1233-44.

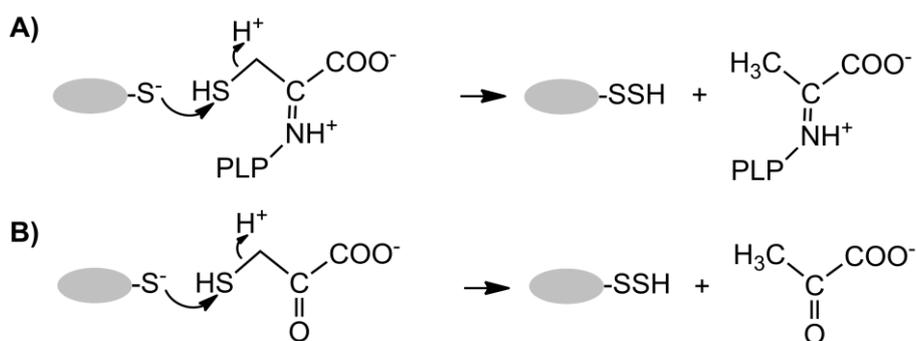
Résultats

- (26) Mulrooney, S. B.; Williams, C. H. Jr. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2188-95.
- (27) Cook, P. F., Ed. (1991) *Enzyme mechanism from isotope effects*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- (28) Rabin, B. R. *Biochem. J.* **1967**, *102*, 22C-23C.
- (29) Frieden, C. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 471-89.
- (30) Antoine, M.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45352-7.
- (31) Talfournier, F.; Colloc'h, N.; Mornon, J. P.; Branlant, G. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 447-57.
- (32) Susan-Resiga, D.; Nowak, T. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12660-71.
- (33) Coincon, M.; Wang, W.; Sygusch, J.; Seah, S.Y. K. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36208-21.

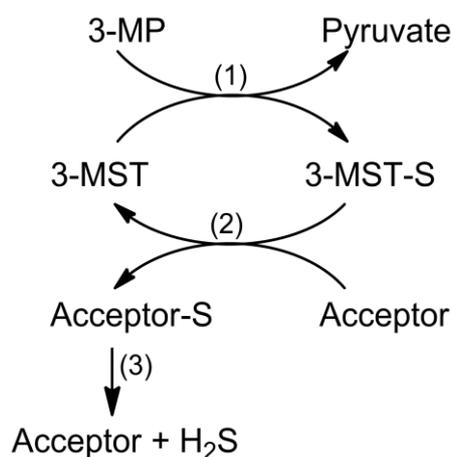
Scheme 1: Mechanism of persulfide formation from hydrogen sulfide and oxidized thiol (A) or sulfur compound and reduced thiol (B).



Scheme 2: Mechanism of persulfide formation catalyzed by cysteine desulfurase (A) or thioltransferase (B).

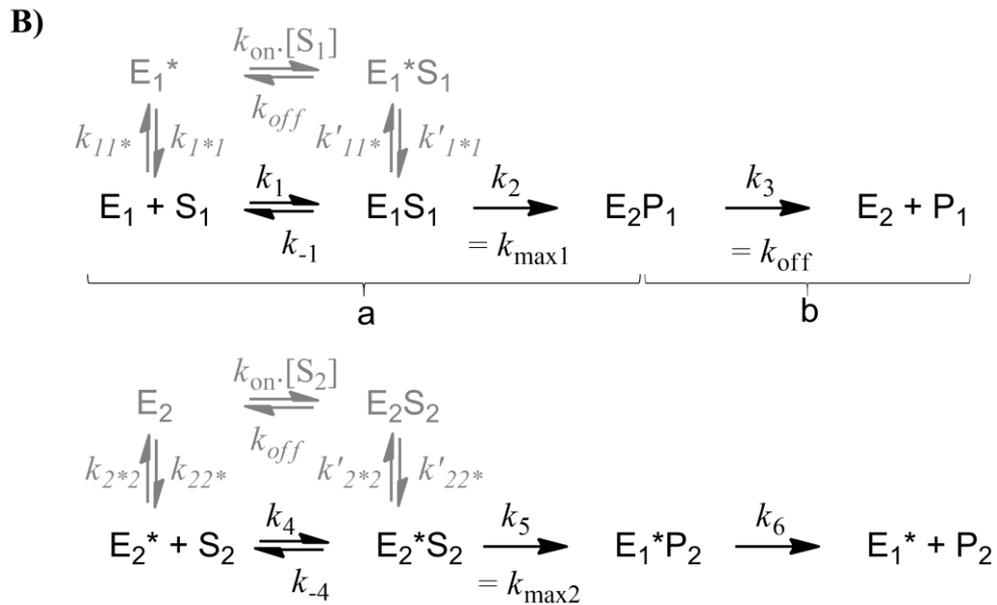
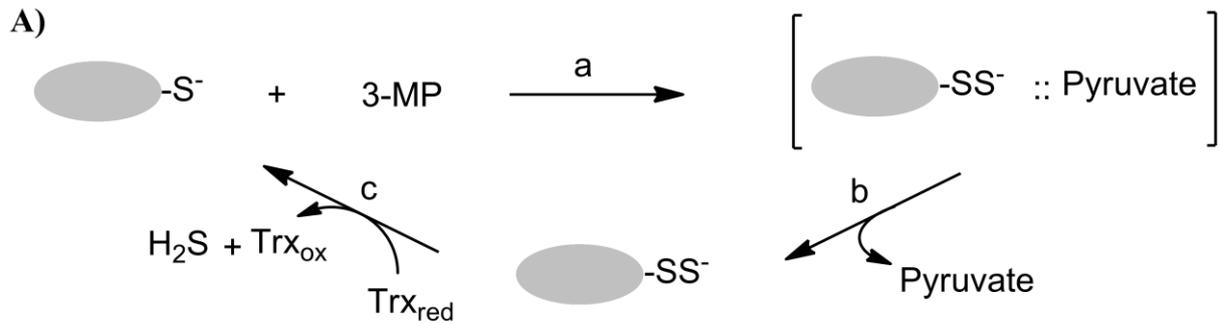


Scheme 3: 3-MST-dependent reactions leading to H₂S production. The sulfur atom is first transferred from 3-MP to 3-MST (1) leading to formation of a persulfide intermediate (3-MST-S), then from 3-MST-S to an acceptor substrate (2). If the reaction product (Acceptor-S) is under persulfide form, its decomposition leads to the formation of H₂S (3).



Résultats

Scheme 4: Scheme of the Trx-dependent reaction (A: a, persulfide formation; b, pyruvate release; c, disulfide oxidized Trx formation); and proposed kinetic model for the 3-MST-catalyzed reaction (B: S₁, 3-MP; S₂, Trx; P₁, pyruvate and P₂, persulfide Trx; E₁/E₁* and E₂/E₂*, thiol and persulfide 3-MSTs, respectively).



Scheme 5: Proposed catalytic mechanism of persulfide 3-MST formation.

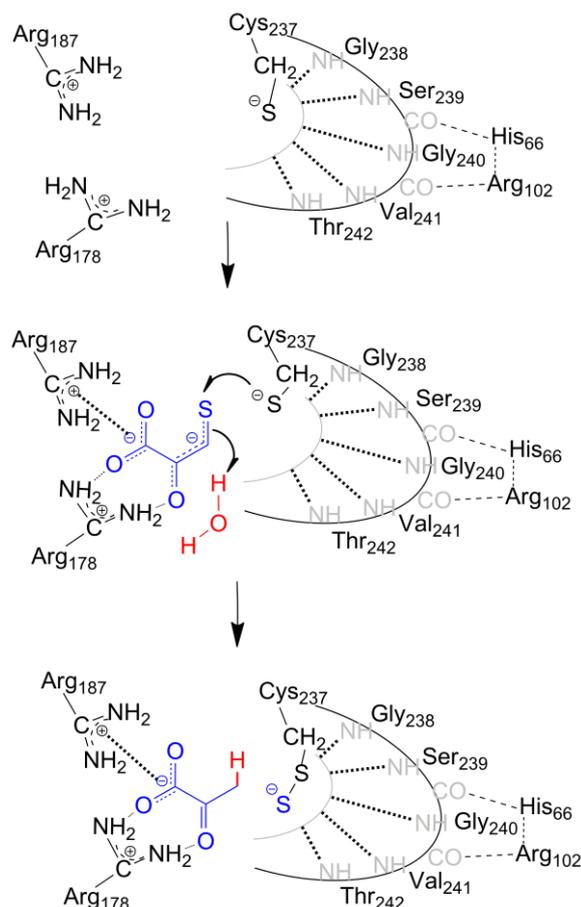
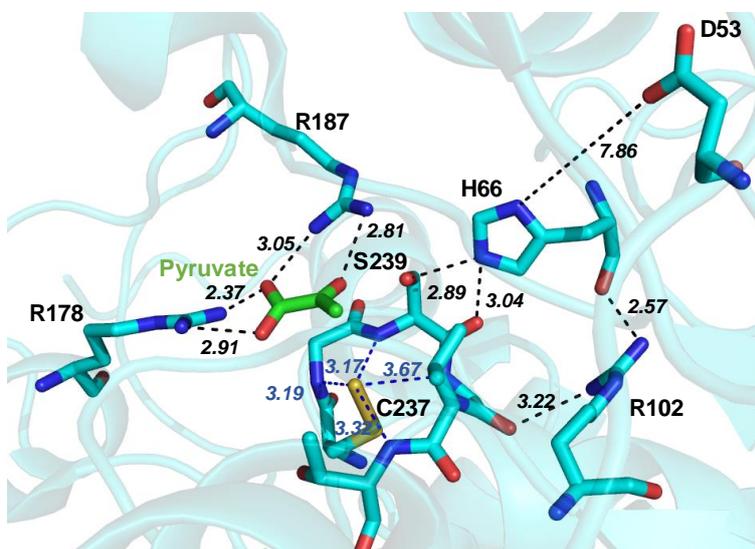


Figure 1: Active site of persulfurated ^h3-MST in complex with pyruvate (PDB code 4JGT).

The figure was generated using PyMOL (www.pymol.org).



Résultats

Figure 2: Kinetics of the first step of sulfur transfer under single turn-over conditions.

(A) The change in fluorescence intensity of 5 μM H66A E_c 3-MST was monitored after mixing with 2 mM 3-MP and experimental data were fit to a monophasic expression (white line). (B) Time-resolved appearance of pyruvate for H66A E_c 3-MST: experimental data were fit to equation 1. (C) and (D) Determination of the catalytic parameters for E_c 3-MST and h^3 3-MST, respectively, using the fluorescence-based approach. The experimental data were fit to equation 2 and the insets show representative transients obtained in the presence of 100 μM 3-MP. The experiments were carried out three times independently and standard error on each experimental point was less than 5%.

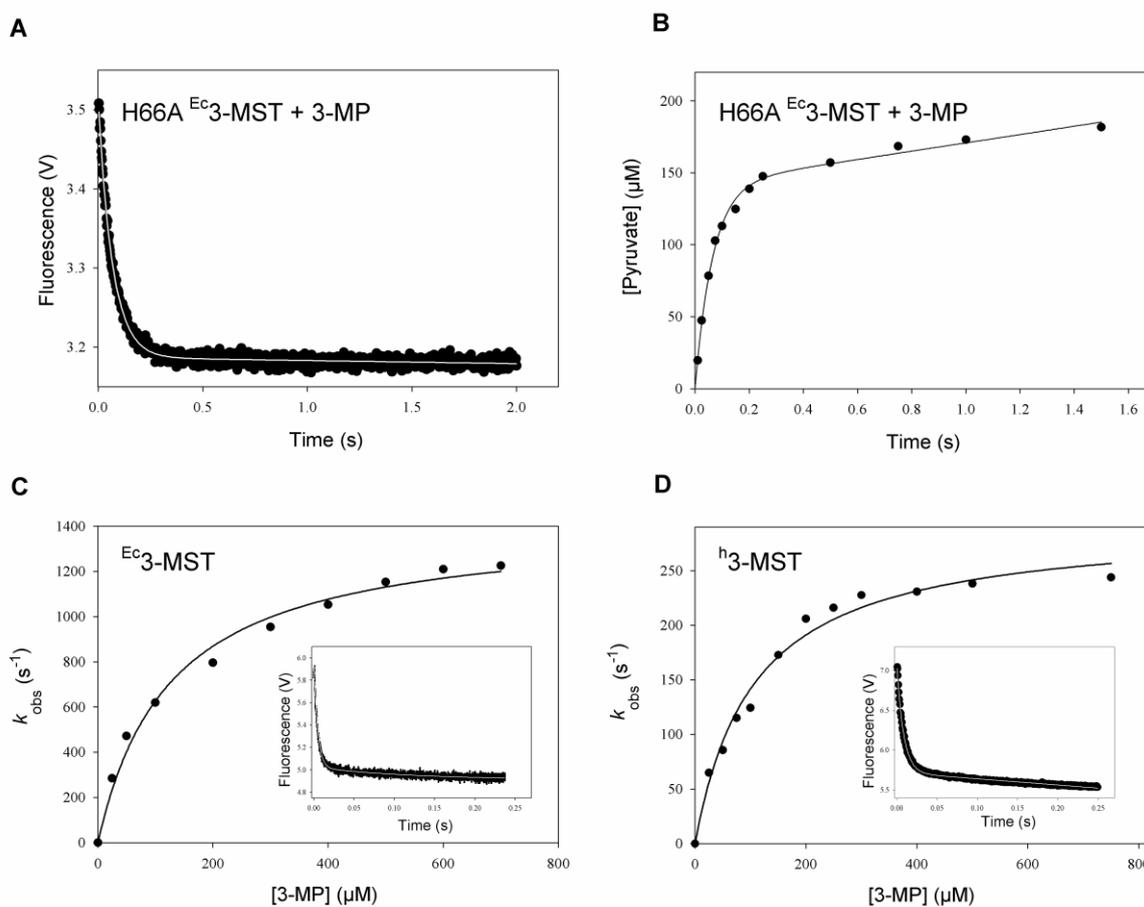
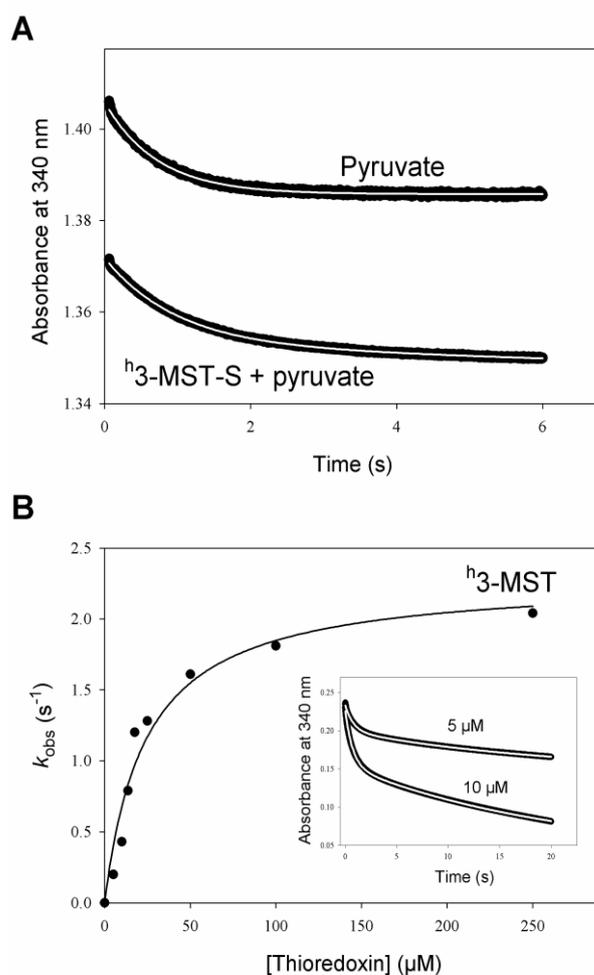


Figure 3: Kinetics of pyruvate dissociation from the persulfide ^h3-MST / pyruvate complex (A) and of sulfur transfer from persulfide ^h3-MST to Trx (B).

(A) Time-dependent decrease in A₃₄₀ after mixing persulfide ^h3-MST (^h3-MST-S) and pyruvate in the presence of LDH/NADH as pyruvate-trapping system. The collected data were fit to a monophasic expression in the absence of ^h3-MST-S (upper trace, white line) and to a biphasic expression in the presence of ^h3-MST-S (lower trace, white line).

(B) Determination of the catalytic parameters for the sulfur transfer from ^h3-MST-S to Trx by using the TrxR/NAPDH regeneration system. The experimental data were fit to equation 4. The inset corresponds to representative transients obtained by mixing 5 or 10 μM ^h3-MST-S with 50 μM Trx. The traces were fit to a biphasic expression (white line).

The experiments were carried out two times independently and standard error on each experimental point was less than 5%.



Résultats

Figure 4: pH-dependence of the absorbance properties of the catalytic Cys237 (A) and of the rate-constant $k_{\max 1}$ (B) for the wild-type (●) and H66A (Δ) ^h3-MSTs.

(A) The pH-dependent ionization of the Cys237 was monitored by the thiolate-specific absorbance at 240 nm over a pH range 4 to 10 in polybuffer A. Experimental data were fit to equation 5.

(B) pH-dependence of the rate constant $k_{\max 1}$ associated with the first step of sulfur transfer. The $k_{\max 1}$ values were determined using the fluorescence-based approach over a pH range 4.5 to 10 in polybuffer A and data were fit to equation 3.

The experiments were carried out two times independently and standard error on each experimental point was less than 5%.

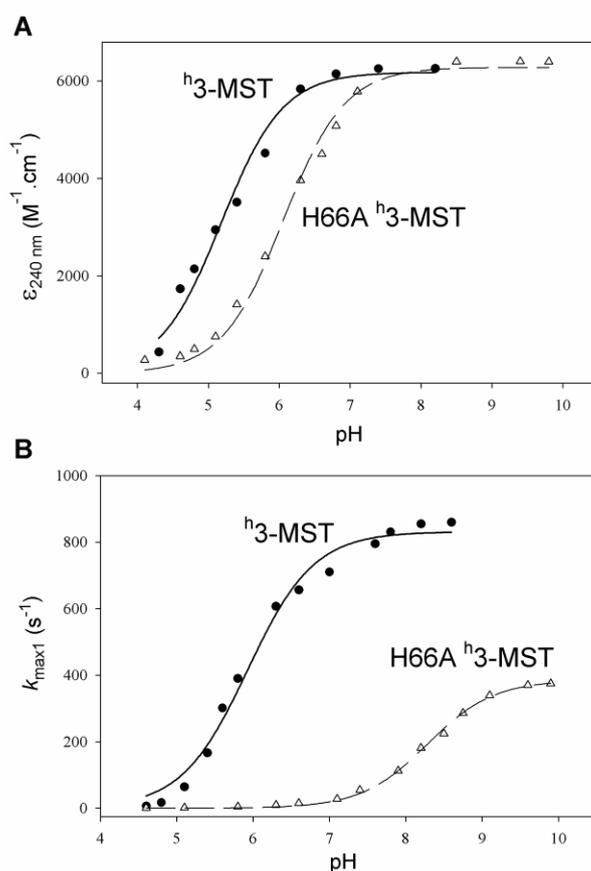


Figure 5: Proton inventory for the first step of sulfur transfer catalyzed by ^h3-MST at pL 8.0.

The normalized $k_{\max 1}$ (k_n/k_0) is plotted against the D₂O mole fraction n . The line represents the best fit of the data to Equation 6. Experiments were carried out three times independently.

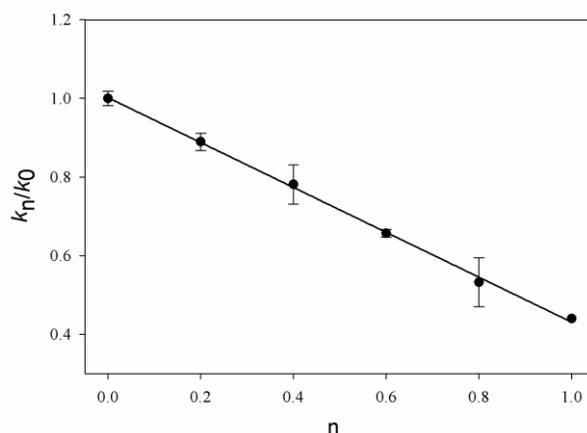


Table 1: Kinetic parameters of the sulfur transfer steps and of the overall reaction for wild-type 3-MSTs and the different mutants.

	<i>Sulfur transfer</i>		<i>Steady-state</i>	
	$k_{\max 1}$ (s ⁻¹)	$K_{3\text{-MP}}$ (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (3-MP) (mM)
<i>Ec3-MST</i>				
wild-type	1520 ± 90	160 ± 30	112 ± 5	1.0 ± 0.1
D53A	460 ± 60	25 ± 7	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1
H66A	25 ± 1	110 ± 10	20 ± 1	0.43 ± 0.06
H66N	1260 ± 90	80 ± 20	75 ± 5	1.4 ± 0.2
R102L	40 ± 1	300 ± 50	49 ± 3	0.9 ± 0.2
R102K	52 ± 5	100 ± 30	59 ± 3	1.0 ± 0.2
H66A / R102L	3.9 ± 0.1	70 ± 10	3.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2
R178L	21 ± 1	100 ± 20	0.05 ± 0.01	15 ± 3
R187L	350 ± 80	(15 ± 6)·10 ³	0.16 ± 0.02	4 ± 1
R178L / R187L	0.5 ± 0.1	200 ± 10	0.068 ± 0.003 ^a	23 ± 2 ^f
S239A	960 ± 70 ^b	620 ± 90	2.5 ± 0.1 ^c	0.24 ± 0.02 ^f
<i>^h3-MST</i>				
wild-type	290 ± 10	110 ± 10	0.47 ± 0.05 ^d	1.7 ± 0.1 ^f
H66A	31 ± 1	120 ± 10	0.48 ± 0.03	0.79 ± 0.16
S239A	340 ± 20	870 ± 130	0.11 ± 0.01 ^e	0.6 ± 0.05 ^f

^{a,b,c,d,e} Parameters obtained by fitting the experimental data to the Hill equation with n values of 1.7 ± 0.2^a, 3.5 ± 0.3^b, 3 ± 0.6^c, 1.7 ± 0.1^d and 2 ± 0.3^e. ^f $K_{0.5}$ values.

SUPPORTING INFORMATIONS

Figure S1: Sequence alignment of ^{Ec}3-MST and ^{h3}3-MST and secondary structure comparison.

The figure was prepared using ESPrpt (<http://esprpt.ibcp.fr>, Robert, X. and Gouet, P. (2014) *Nucl. Acids Res.* **42**(W1), W320-W324).

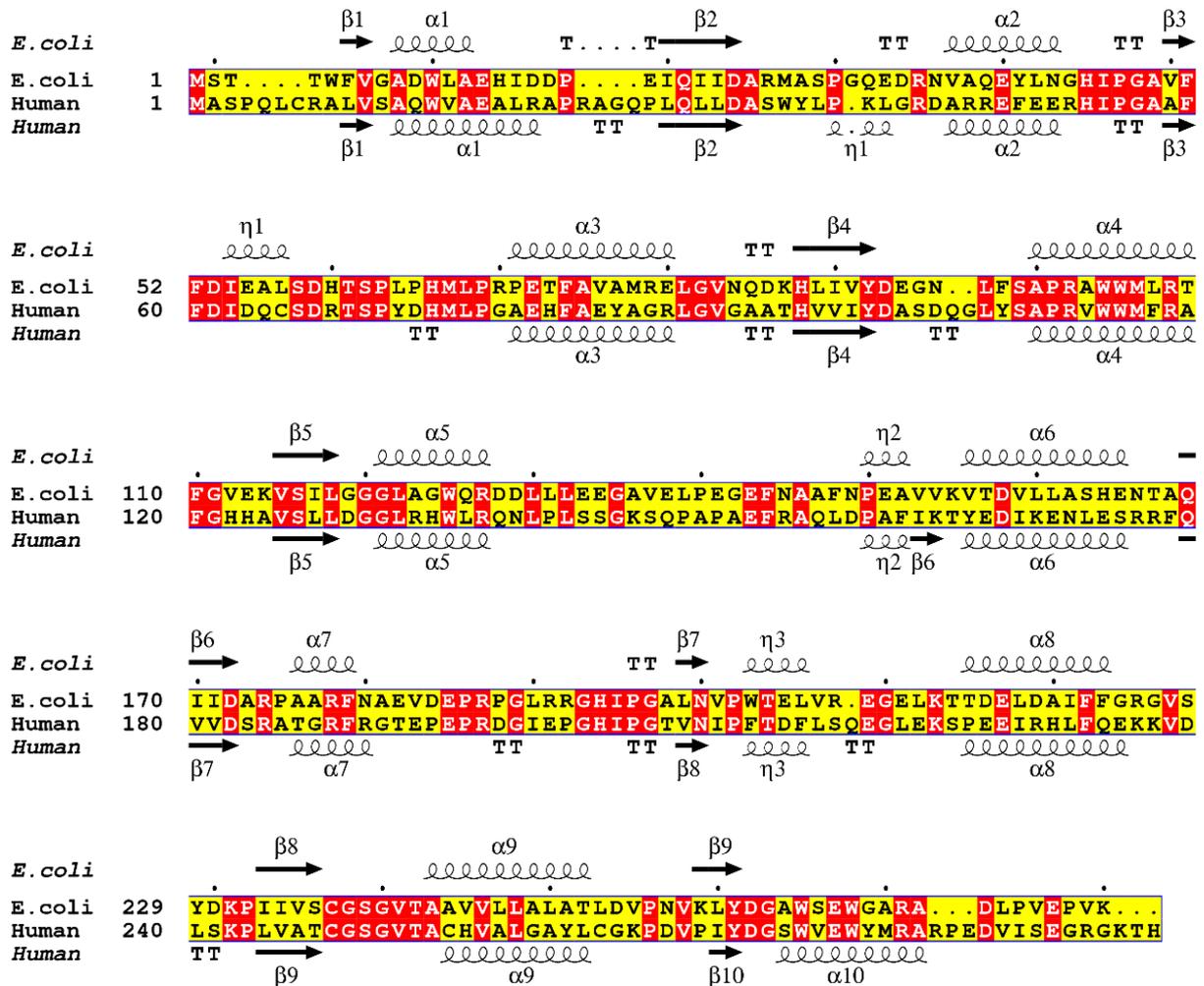
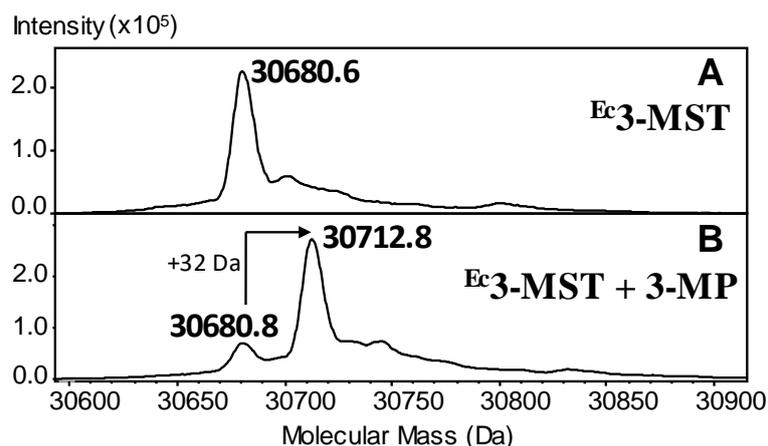


Figure S2: Mass spectrometry spectra of the ^{Ec}3-MST under denaturing conditions.

Electrospray mass spectrometry spectra of 10 μ M ^{Ec}3-MST prior (A) or after incubation with 2 mM 3-MP (B). The molecular masses of the enzyme are in agreement with the 30680.6 Da predicted from the sequence (A) and with the formation of a persulfide intermediate on the catalytic Cys237 upon incubation with 3-MP (Dm + 32 Da). The experiments were carried out two times independently.



Supplementary materials Mass spectrometry analyses – After 30 min incubation with 5 mM DTT, ^{Ec}3-MST solution was desalted by passing the solution through a PD Mini-Trap G-25 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM ammonium acetate buffer, pH 6.8. A 5-fold molar excess of 3-MP was then added, and after 10 min incubation at 25°C, samples were desalted following the same procedure. Mass spectrometry measurements were performed before, and after incubation with 3-MP, on an ESI-Q-TOF type (Bruker) under denaturing conditions with 50 % acetonitrile, 49 % water and 1 % formic acid. The mass spectra were recorded in the positive ion mode on the mass range 500-2500 m/Z and deconvoluted with the MaxEnt software (Bruker).

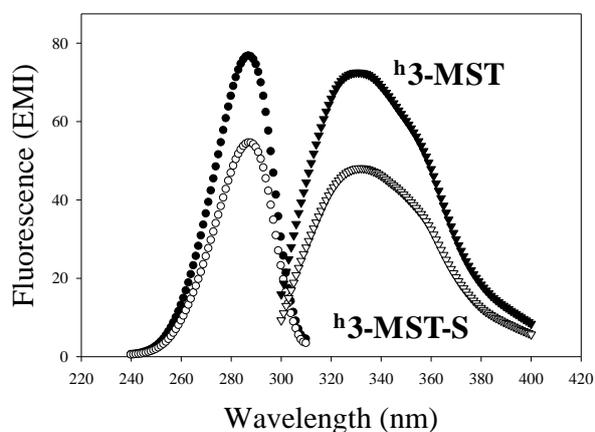
Résultats

Figure S3: Fluorescence spectra of wild-type ^{h3}-MST (A) and ^{Ec3}-MST (B) in reduced and persulfide states.

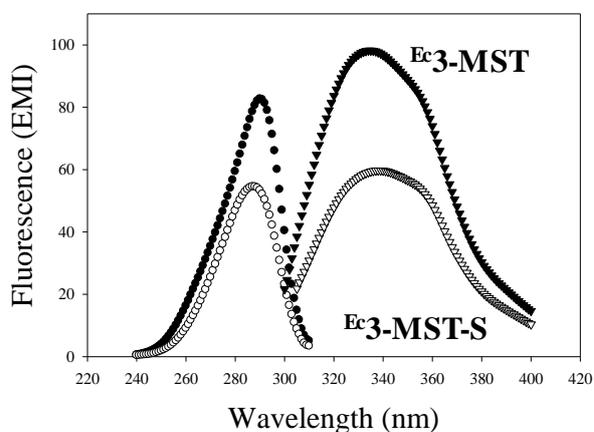
(A) excitation spectra of reduced ^{h3}-MST (●) and persulfide ^{h3}-MST (^{h3}-MST-S, ○) (emission followed at 330 nm), emission spectra of reduced ^{h3}-MST (▼) and ^{h3}-MST-S (▽) (excitation at 287 nm).

(B) excitation spectra of reduced ^{Ec3}-MST (●) and persulfide ^{Ec3}-MST (^{Ec3}-MST-S, ○) (emission followed at 335 nm), emission spectra of reduced ^{Ec3}-MST (▼) and ^{Ec3}-MST-S (▽) (excitation at 287 nm).

A



B



II. Mécanisme catalytique de la TSTD1

En l'absence de séquences signatures, hormis la boucle catalytique C-x(2)-[G/H]-x(2), et d'études cinétiques détaillées, aucun mécanisme catalytique n'a été proposé pour les TST. Pour caractériser ce mécanisme, nous avons choisi comme modèle d'étude la TSTD1, une enzyme humaine à un seul domaine rhodanèse potentiellement impliquée dans le complexe SOU (se rapporter au chapitre III de l'introduction et chapitre IV des résultats). Dans un premier temps, l'étude a été réalisée en présence de thiosulfate et/ou de 3-MP comme donneur et de DHLA (Figure 49) comme accepteur de soufre, sur la forme sauvage de l'enzyme.

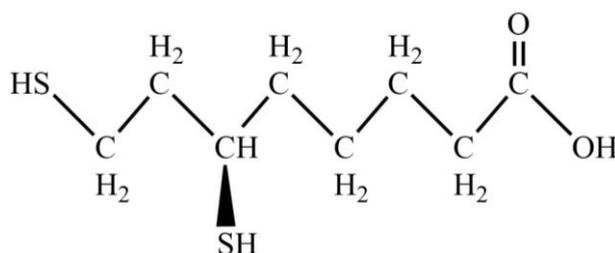


Figure 49. Structure chimique du (R)-DHLA.

Afin d'identifier des résidus potentiellement impliqués dans la catalyse et/ou la reconnaissance des substrats, la structure tridimensionnelle de la TSTD1 a été obtenue en collaboration avec les Drs. Frédérique Favier et Claude Didierjean (CRM² – Université de Lorraine). Leur rôle a été évalué par une approche de mutagenèse dirigée couplée à la caractérisation des paramètres cinétiques de la première étape de transfert de soufre ($k_{\max 1}$ et $K_{3\text{-MP}}$ ou K_{TS}).

1) En présence de TS

En présence de DHLA, la réaction conduit à la production d'H₂S comme attendu pour un accepteur à thiol. A l'état stationnaire, la TSTD1 présente une coopérativité cinétique caractérisée par une allure sigmoïdale des tracés $k_{\text{obs}} = f([\text{substrat}])$ avec un k_{cat} de $1,5 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, et des valeurs de K_M respectivement de $95 \pm 8 \text{ mM}$ et $14,5 \pm 0,6 \text{ mM}$ pour le TS et le DHLA. La première étape de transfert de soufre est rapide ($k_{\max 1}$ de $43 \pm 3 \text{ s}^{-1}$) mais relativement peu efficace avec une constante de vitesse d'ordre 2 ($k_{\max 1}/K$) de $2,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Par contre, la seconde étape est elle-aussi rapide ($k_{\max 2}$ de $225 \pm 9 \text{ s}^{-1}$) mais nettement plus efficace avec une constante de vitesse d'ordre 2 ($k_{\max 2}/K$) de $1,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit un facteur de 460 (Figure 50).

Résultats

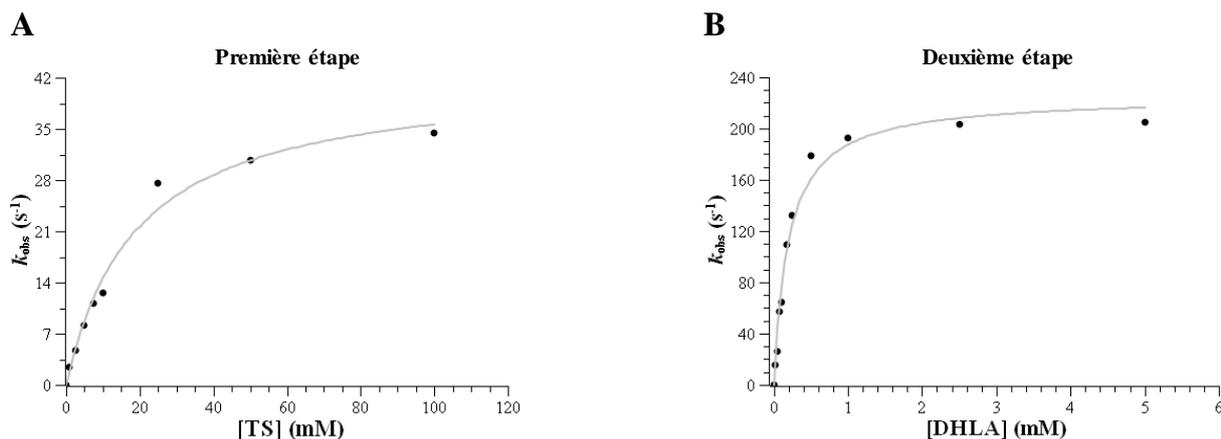


Figure 50. Etude des étapes de transfert de soufre en présence de TS (A) et DHLA (B).

A : Graphique $k_{obs} = f([TS])$. Les données expérimentales (●) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) ce qui permet de déterminer une constante de vitesse maximale de la première étape k_{max1} de 43 ± 3 s⁻¹ et une constante d'affinité apparente K de 18 ± 4 mM pour le TS.

B : Graphique $k_{obs} = f([DHLA])$. Les données expérimentales (●) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) ce qui permet de déterminer une constante de vitesse maximale de la deuxième étape k_{max1} de 225 ± 9 s⁻¹ et une constante d'affinité apparente K de $0,20 \pm 0,03$ mM pour le DHLA.

Les constantes de vitesse k_{max1} et k_{max2} étant largement supérieures au k_{cat} , l'étape cinétiquement limitante de la réaction globale n'est pas associée à ces processus de transfert de soufre mais à la libération des produits, à la formation d'H₂S, ou encore à des changements conformationnels associés.

2) En présence de 3-MP

La TSTD1 présente également une coopérativité cinétique en présence de 3-MP avec un k_{cat} de $0,015 \pm 0,001$ s⁻¹, et des valeurs de K_M respectivement de 14 ± 1 mM et $0,10 \pm 0,01$ mM pour le 3-MP et le DHLA. De façon surprenante par rapport à la littérature, la première étape de transfert de soufre est nettement plus efficace avec une valeur de k_{max1}/K 46 fois plus élevée qu'en présence de TS. Contrairement à ce qui était observé en présence de TS, la première étape est non seulement rapide (k_{max1} de 318 ± 13 s⁻¹) mais également efficace avec une constante de vitesse d'ordre 2 (k_{max1}/K) de $1,1 \cdot 10^5$ M⁻¹.s⁻¹, soit seulement diminuée d'un facteur 10 par rapport à la seconde étape (paragraphe précédent). Par contre, les processus de transfert de soufre restent non cinétiquement limitants (k_{max1} et $k_{max2} \gg k_{cat}$) (Figure 51).

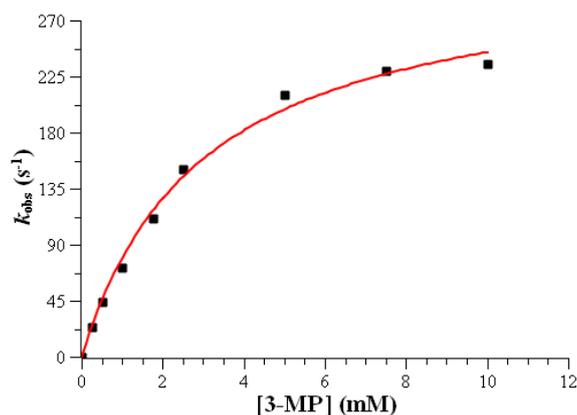


Figure 51. Première étape de transfert de soufre en présence de 3-MP.

Graphique $k_{obs} = f([3-MP])$. Les données expérimentales (■) ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) ce qui permet de déterminer une constante de vitesse maximale de la première étape k_{max1} de $318 \pm 13 s^{-1}$ et une constante d'affinité apparente K de $3,0 \pm 0,3 mM$ pour le 3-MP.

A l'instar de ce que nous avons montré pour la 3-MST, la réaction pourrait être limitée par la vitesse de dissociation du pyruvate à partir du complexe binaire TSTD1 persulfure/pyruvate et cette hypothèse a été testée en utilisant le système couplé lactate déshydrogénase (LDH)/NADH pour déterminer la valeur de la constante de vitesse de dissociation (k_{off}).

En présence de l'enzyme sous forme persulfure, de LDH et d'un excès de NADH et de pyruvate, la cinétique présente deux phases : une phase rapide d'oxydation du NADH correspondant à l'utilisation du pyruvate libre, et une phase lente correspondant à la libération du pyruvate à partir du complexe binaire formé avec l'enzyme (Figure 52).

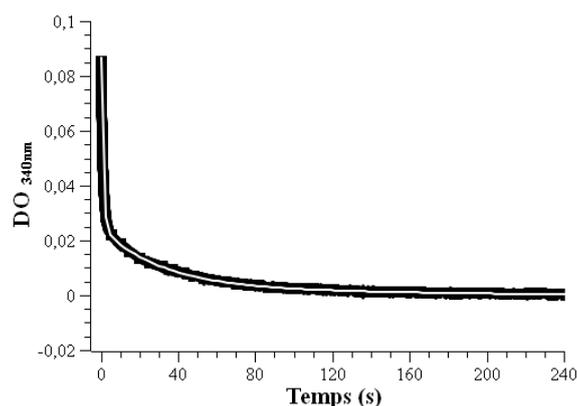


Figure 52. Détermination de la constante de dissociation k_{off} du pyruvate via l'utilisation du système couplé LDH/NADH.

La constante de vitesse de libération du pyruvate a été mesurée par l'utilisation du stopped-flow dans du tampon A à 30°C. Une première seringue contenait 10 μM de TSTD1 sous forme persulfure et 20 μM de pyruvate tandis que la deuxième contenait 20 μM de LDH et 0,3 mM de NADH (trace noire). Le signal d'absorbance obtenu a été ajusté à l'équation d'une double exponentielle (ajustement en blanc, Équation 13) où la première phase correspond au pyruvate libre et la deuxième au pyruvate libéré à partir du complexe binaire TSTD1 persulfure/pyruvate. Ces expériences ont permis de mesurer un k_{off} du pyruvate de $0,018 \pm 0,001 s^{-1}$.

Résultats

Cette technique permet de mesurer des constantes de vitesse inférieures à 2 s^{-1} (constante de vitesse de la phase rapide dans les conditions utilisées). La valeur de k_{off} étant du même ordre de grandeur que le k_{cat} ($0,018$ vs. $0,015 \text{ s}^{-1}$), l'étape cinétiquement limitante est associée à la dissociation du pyruvate.

La première étape de transfert de soufre étant rapide quel que soit le donneur utilisé, il est nécessaire que : (1) la Cys79 catalytique soit sous forme déprotonée pour réaliser une attaque nucléophile efficace, (2) le substrat soit bien positionné par rapport à la Cys79 et (3) les charges négatives présentes dans le complexe Michaelien et l'état de transition soient neutralisées. De plus, en présence de 3-MP, le pyruvate-énolate doit être protoné (Figure 48, mécanisme 3-MST, complexe B).

La détermination du pK_a de la cystéine catalytique dans l'enzyme libre a été réalisée en exploitant les propriétés d'absorbance du groupement thiolate à 240 nm. Le pK_{app} de 5,1 déterminé indique que la Cys79 est déjà sous forme déprotonée dans l'enzyme libre (Figure 53).

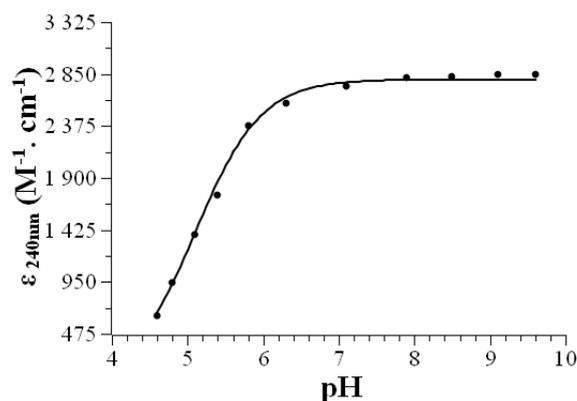


Figure 53. Détermination du pK_{app} de la Cys79 catalytique.

Variation de l'absorbance du groupement thiolate à 240 nm en fonction du pH. Les mesures ont été réalisées dans le tampon P de force ionique constante en présence de $10 \mu\text{M}$ de la TSTD1. Les données expérimentales (●) obtenues ont été ajustées à l'équation d'une sigmoïde (trait noir, Équation 6) permettant de déterminer un pK_{app} de $5,10 \pm 0,01$.

3) Apports de la structure 3D

La stratégie consistait à obtenir la première structure d'une TST humaine à haute résolution de manière à identifier des résidus présents dans le site actif potentiellement impliqués dans la catalyse. Le protocole de production/purification a été préalablement optimisé de façon à disposer d'une solution protéique concentrée mono-disperse et pure à homogénéité (indice de polydispersité de 0,036 mesuré au DLS). Les cristaux ont été obtenus grâce à la

méthode microbatch à 4°C dans la condition suivante : 25 mg/L de TSTD1, 20% de PEG 3000, 0,1 M de citrate, pH 5,5. La structure a été obtenue à une résolution de 1,5 Å par remplacement moléculaire en utilisant celle d'une TST hypothétique YOR285W de *Saccharomyces cerevisiae* (code PDB : 3d1p) (Figure 54).

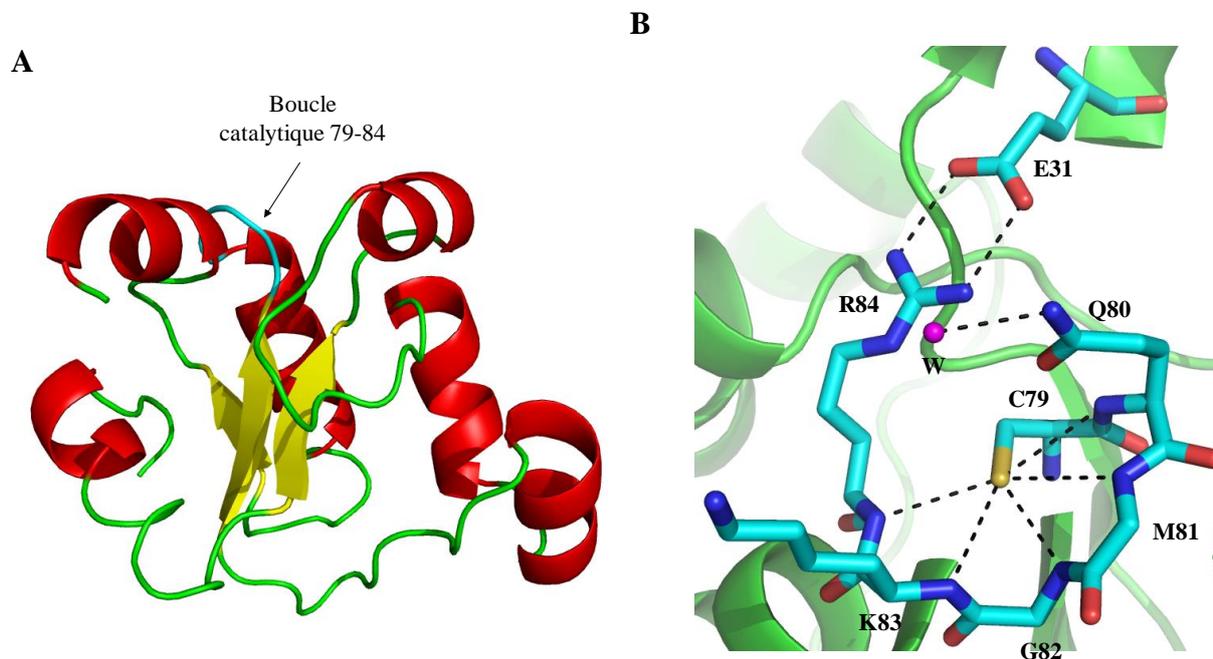


Figure 54. Structure cristallographique de la TSTD1 humaine représentée en utilisant le logiciel PyMol (Shrödinger Inc.).

A : Vue globale de la structure de la TSTD1 humaine. Cette protéine se compose d'un domaine rhodanèse constitué d'un feuillet β central formé de 3 brins entouré de 6 hélices α . La chaîne principale est représentée en mode « rubans et flèches ». Les structures secondaires sont présentées selon le code couleur suivant : les feuillets β sont en jaune, les hélices α en rouge et les boucles en vert. La boucle catalytique conservée est représentée en bleu cyan.

B : Les résidus potentiellement impliqués dans la catalyse sont représentés en « boules et bâtons » selon le code couleur suivant : les atomes de soufre sont en jaune, les atomes de carbone en bleu cyan, les atomes d'azote en bleu, les atomes d'oxygène en rouge et la molécule d'eau (W) en violet.

Comme attendu, la TSTD1 possède le repliement classique des thioltransférases à domaine rhodanèse. Au niveau du site actif : (1) la Cys79 catalytique est présente sous forme thiol ; (2) les groupements NH de la chaîne principale de la boucle catalytique CQMGKR 79- 84 sont à distance compatible avec la formation de liaisons H avec le soufre de la Cys79 ; (3) l'Arg84 pourrait être impliquée dans la stabilisation des charges négatives du substrat et/ou de l'état de transition ; (4) le Glu31 pourrait participer au positionnement de l'Arg84 par l'établissement d'un pont salin ; et (5) la Gln80 pourrait stabiliser une molécule d'eau impliquée dans la protonation de l'énolate-pyruvate.

Résultats

4) Rôle des résidus Glu31 et Arg84

Afin d'évaluer la contribution de la charge positive du groupement guanidinium de l'Arg84, ce résidu a été remplacé soit par une Lys pour conserver une charge positive mais ponctuelle, soit par une Leu, résidu relativement isostère de l'Arg et non chargé. En présence de TS comme donneur, les substitutions R84K et R84L conduisent à la perte de l'activité thioltransférase avec une constante de vitesse associée à l'étape de transfert de soufre diminuée *a minima* d'un facteur $4,3 \cdot 10^4$ ($k_{\max 1} < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. 43 s^{-1}) par rapport à la forme sauvage, ce qui explique l'absence d'activité à l'état stationnaire (Tableau 2). A l'inverse, l'impact de ces substitutions est minime lorsque le 3-MP est utilisé comme substrat avec des paramètres cinétiques associés à la première étape ou à l'état stationnaire quasi-inchangés, la différence la plus notable étant la diminution d'un facteur 3 de la constante de vitesse $k_{\max 1}$ pour le variant R84L.

Le rôle de l'interaction Glu31-Arg84 dans la catalyse a été évalué en substituant le résidu Glu31 soit par une Ala pour rompre cette interaction, soit par une Gln pour conserver la possibilité d'établir des interactions de type liaison H. En présence de TS, ces substitutions ont un impact clairement différent avec une perte totale d'activité pour le variant E31A alors que les paramètres cinétiques restent inchangés pour le variant E31Q (Tableau 2). A l'inverse, comme pour les variants de la position 84, ces substitutions n'ont pas d'effet sur l'activité thioltransférase en présence de 3-MP.

En présence de TS, l'ensemble de ces résultats montrent que la formation de l'intermédiaire persulfure dépend de la présence d'une charge positive délocalisée en position 84 suggérant que le groupement guanidinium participe à la stabilisation de plusieurs charges négatives présentes sur les atomes d'oxygène du substrat et/ou de l'état de transition. En effet, la nature multivalente de cette interaction est essentielle, une interaction monovalente n'étant pas suffisante pour conserver l'activité. De plus, l'interaction résidu Glu31-Arg84 apparaît essentielle au positionnement de la chaîne latérale de l'Arg84, et par conséquent à la catalyse, qu'elle soit de type pont salin ou liaison H. Par contre, ces résidus ne jouent apparemment aucun rôle dans la catalyse en présence de 3-MP.

Tableau 2 Paramètres cinétiques de la première étape et de la réaction globale catalysée par la forme sauvage et des différents variants de la TSTD1.

Toutes les expériences ont été réalisées dans du tampon A à pH 8 à 30°C. Les paramètres cinétiques de la première étape ont été obtenus dans des conditions de cycle catalytique unique. Les paramètres cinétiques à l'état stationnaire ont été déterminés avec l'électrode H₂S en présence de DHLA comme accepteur.

(a) Pas d'activité détectée ($k_{\max} < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Les valeurs de K_M correspondent à des valeurs de $K_{0,5}$.

	Transfert de soufre		Etat stationnaire		
	$k_{\max 1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K \text{ (mM)}$	$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (mM)}$	n
3-MP					
Sauvage	318 ± 13	3,0 ± 0,3	0,015 ± 0,001	14 ± 1	1,5 ± 0,2
R84L	101 ± 4	2,8 ± 0,4	0,016 ± 0,001	57 ± 1	3,3 ± 0,2
R84K	184 ± 6	3,8 ± 0,4	0,025 ± 0,001	23 ± 1	2,8 ± 0,4
E31A	200 ± 7	10 ± 1	0,021 ± 0,003	17 ± 6	1,2 ± 0,4
E31Q	105 ± 6	3,6 ± 0,7	0,025 ± 0,002	13 ± 2	1,4 ± 0,2
Q80A	0,30 ± 0,01	3,2 ± 0,3	0,015 ± 0,003	18 ± 7	1,4 ± 0,1
TS					
Sauvage	43 ± 3	18 ± 4	1,2 ± 0,1	60 ± 8	1,7 ± 0,2
R84L	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
R84K	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
E31A	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
E31Q	29 ± 1	4,6 ± 0,3	1,1 ± 0,1	69 ± 7	1,3 ± 0,1
Q80A	60 ± 2	48 ± 5	0,9 ± 0,1	81 ± 6	1,5 ± 0,2

5) Rôle du résidu Gln80

Le rôle du résidu Gln80 dans la catalyse thioltransférase 3-MP-dépendante a été évalué en le substituant par un résidu Ala. Alors que les paramètres cinétiques à l'état stationnaire et la constante d'affinité apparente $K_{3\text{-MP}}$ ne sont pas modifiés, une diminution drastique d'un facteur 1000 de la valeur du $k_{\max 1}$ est observée. Ces résultats suggèrent que le résidu Gln est, comme proposé, impliqué dans la protonation du pyruvate-énolate de façon indirecte *via* la stabilisation d'une molécule d'eau.

L'effet isotopique cinétique de solvant de 3,3 déterminé pour la forme sauvage montre que la protonation du pyruvate-énolate est cinétiquement déterminante pour l'étape de transfert de soufre, le caractère limitant de ce processus étant amplifié pour le variant Q80A (effet de 5,6 vs. 3,3). Les expériences d'inventaires de protons ont montré qu'un seul proton est impliqué dans la catalyse pour la forme sauvage alors qu'il y en aurait trois dans le cas du variant Q80A (Figure 55). Dans ce cas, la perte de l'interaction Gln80-H₂O serait compensée par un réseau de liaisons H entre plusieurs molécules d'H₂O, d'où l'implication d'un nombre plus élevé de protons dans la catalyse.

Résultats

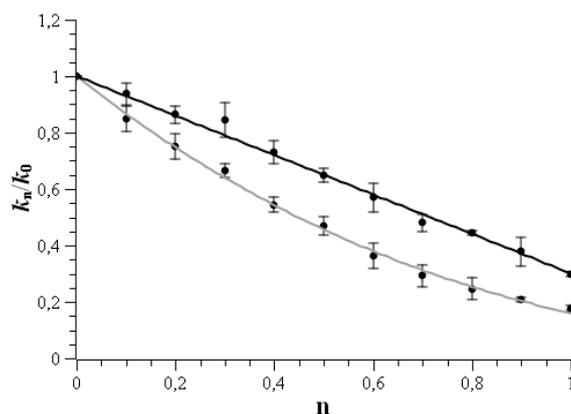


Figure 55. Inventaires de protons pour la réaction de transfert de soufre catalysée par la forme sauvage et le variant Q80A de la TSTD1.

Les données expérimentales (●) ont été ajustées à l'Équation 12 simplifiée de Gross-Butler (trace noire pour la TSTD1 sauvage et grise pour le mutant Q80A). Pour la TSTD1 sauvage, un seul proton est impliqué et l'effet isotopique cinétique de solvant est de $3,30 \pm 0,01$, alors que pour le variant Q80A, trois protons sont impliqués avec un effet de $5,60 \pm 0,09$.

La constante k_0 correspond à la constante de vitesse de la première étape effectuée en présence d' H_2O , k_n la constante de vitesse en présence de D_2O et n le ratio D_2O/H_2O .

6) Scénarii de la première étape (TS vs. 3-MP)

En présence de TS, la formation d'un complexe Michaelien compétent dépend du positionnement correct de l'atome de soufre du TS par rapport à la Cys79 catalytique et de la stabilisation des charges négatives du substrat, assurés par le groupement guanidinium de l'Arg84, lui-même correctement orienté par son interaction avec le Glu31 (Figure 56 A). Ensuite, la cystéine catalytique, déjà stabilisée sous forme thiolate dans l'enzyme libre par les NH peptidiques de la boucle catalytique, réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre du substrat, conduisant à la formation de l'intermédiaire persulfure et de sulfite.

Lorsque le 3-MP est utilisé comme donneur, le scénario est similaire à celui que nous avons proposé pour les 3-MST avec une formation de l'intermédiaire persulfure et du pyruvate dépendant de la protonation du pyruvate-énolate par une molécule d'eau. Par contre, nos résultats permettent d'identifier clairement un résidu impliqué dans le positionnement de cette molécule d'eau, en l'occurrence la Gln80 (Figure 56 B).

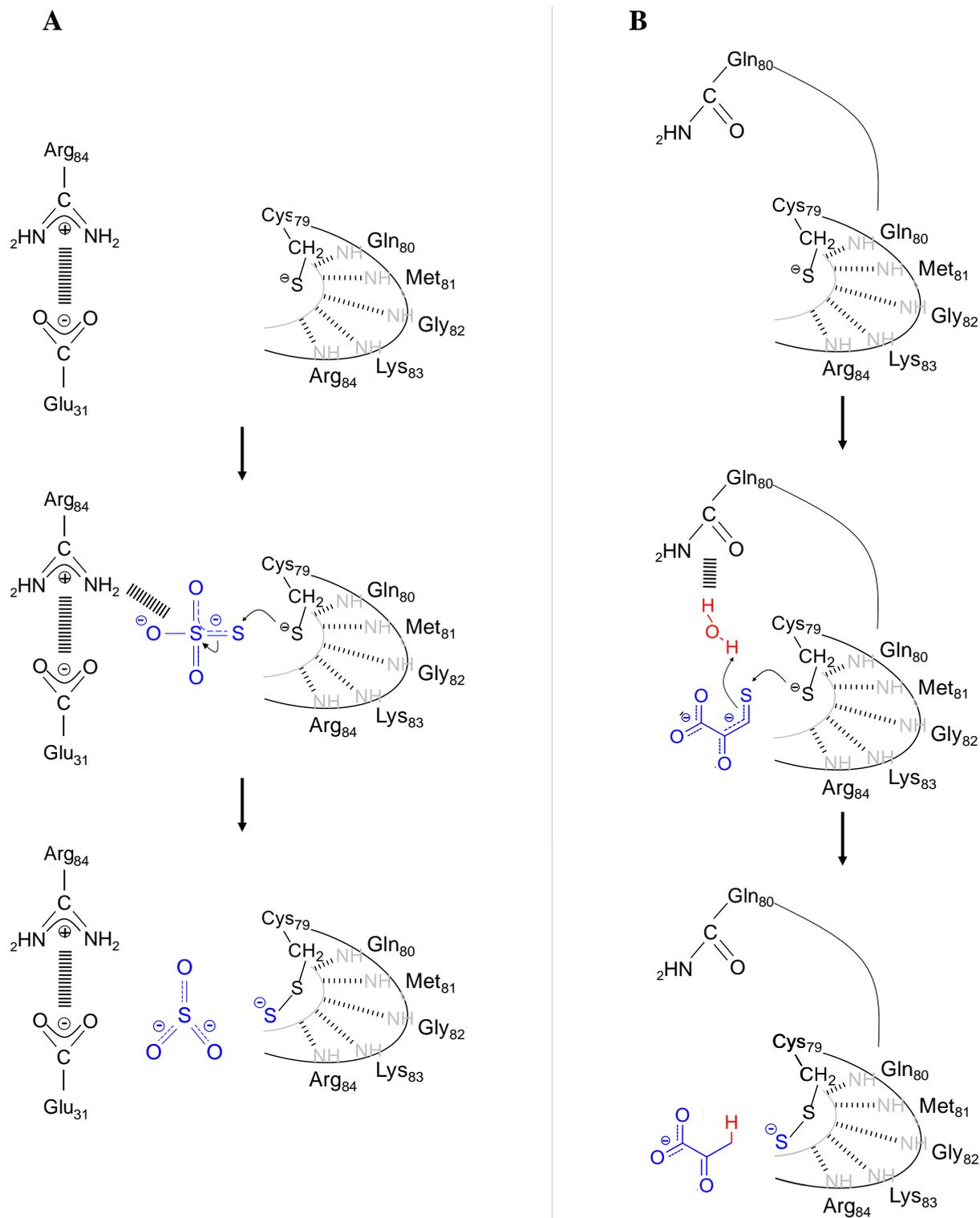


Figure 56. Scenarii catalytiques proposés en présence de TS (A) ou de 3-MP (B) pour la TSTD1.

Les acides aminés sont représentés en noir et selon le code à 3 lettres, les NH peptidiques de la boucle catalytique sont représentés en gris. Les substrats sont représentés en bleu et la molécule d'eau impliquée dans la protonation du pyruvate-énolate est représentée en rouge.

Chapitre III. Etude de la spécificité de substrats des thioltransférases à domaine rhodanèse

L'étude de la spécificité de substrat a été réalisée sur des enzymes humaines (^h3-MST, TSTD1 et Rhodanèse) et bactériennes (^{Ec}3-MST et GlpE). Les substrats testés sont ceux décrits dans la littérature pour être des substrats des thioltransférases, c'est-à-dire le 3-MP, le TS et le GSSH comme donneurs de soufre, la Trx, le DHLA, la cystéine, le GSH et le sulfite comme accepteurs. La CysSSH a été également testée comme substrat donneur car c'est le composé persulfure le plus abondant dans la cellule après le GSSH et l'H₂S a été étudié comme accepteur afin de mettre en évidence un nouveau mécanisme de formation d'H₂S₂. Pour chacun de ces substrats, les paramètres cinétiques de la première ou de la deuxième étape de transfert de soufre ont été déterminés, de même que les paramètres à l'état stationnaire. L'étude des étapes de transfert de soufre, et plus précisément de leur efficacité catalytique en présence de différents substrats (k_{\max}/K), permettra de déterminer les spécificités structurales de substrats donneurs et accepteurs de soufre. De plus, l'étude des réactions à l'état stationnaire (k_{cat}/K_M) permettra de valider les activités mises en évidence.

I. Spécificités de substrats donneurs de soufre

1) Les 3-MST

Comme attendu pour la ^h3-MST, le 3-MP est un meilleur donneur que le thiosulfate avec une constante de vitesse d'ordre 2 ($k_{\max 1}/K$) 100 fois plus élevée dû majoritairement à un effet affinité apparente (K) (Figure 57, Tableau 3).

Contrairement à ce qui était proposé dans la littérature (Colnaghi *et al.*, 2001), la ^{Ec}3-MST présente quant à elle une spécificité stricte pour le 3-MP, le TS étant un inhibiteur non compétitif mixte pour cette enzyme (résultats non montrés). Enfin, le fait que le GSSH et la CysSSH ne soient pas substrats pour les deux enzymes suggère qu'elles utilisent préférentiellement le 3-MP comme donneur.

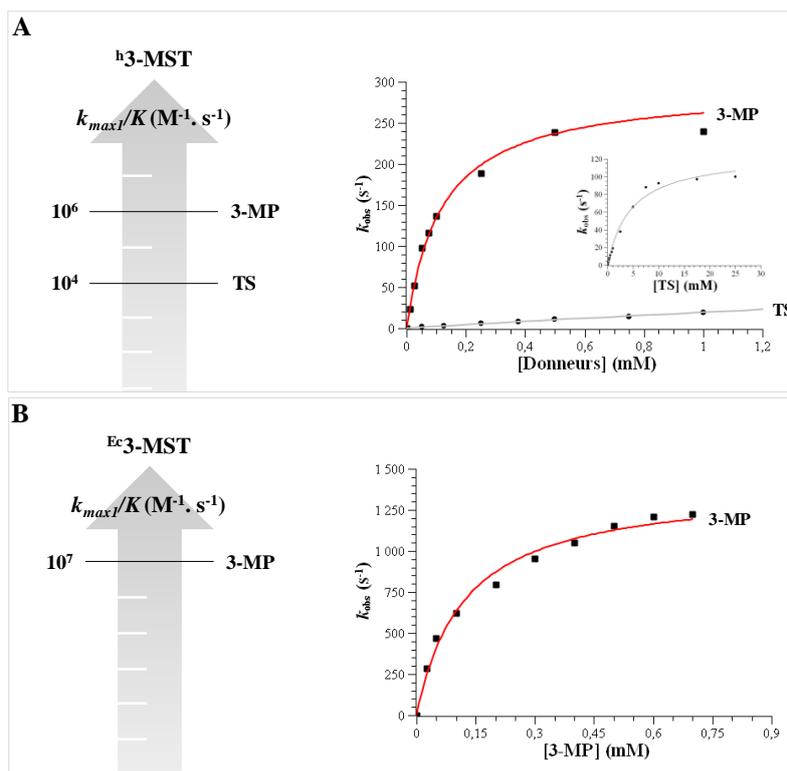


Figure 57. Etude de la spécificité de substrat donneur de soufre pour les 3-MST humaine (A) et d'*E. coli* (B) via l'étude de la première étape.

Graphique $k_{\text{obs}} = f([\text{donneur}])$ pour la $^h3\text{-MST}$ (A) et la $^{\text{Ec}}3\text{-MST}$ (B). Les données expérimentales (■) et (●), correspondant respectivement aux k_{obs} mesurés en présence de 3-MP et TS, ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la première étape k_{max1} et la constante d'affinité apparente K pour le substrat testé.

Les flèches sont une représentation de la constante k_{max1}/K ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour chacun des substrats testés, ce schéma permet de montrer la différence d'efficacité catalytique de transfert de soufre pour une même enzyme en présence de différents substrats donneurs.

Tableau 3. Paramètres cinétiques de la première étape catalysée par les 3-MST en présence de différents substrats donneurs de soufre.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque des 3-MST liée à la formation de l'intermédiaire persulfure. ^(a) Pas d'activité détectée ($k_{\text{max}} < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

$^{\text{Ec}}3\text{-MST}$	Première étape		
		k_{max1} (s^{-1})	K (mM)
3-MP	1400 ± 50	$0,125 \pm 0,015$	1.10^7
TS	(a)	(a)	(a)
$^h3\text{-MST}$	k_{max1} (s^{-1})	K (mM)	k_{max1}/K ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
3-MP	293 ± 11	$0,107 \pm 0,013$	$2,7.10^6$
TS	172 ± 7	7 ± 1	$2,4.10^4$

2) Les TST

Quelle que soit la TST étudiée, les composés persulfures tels que le GSSH et la CysSSH s'avèrent être d'excellents substrats avec des efficacités catalytiques (k_{max1}/K) de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, à l'exception de la TSTD1 pour laquelle le GSSH n'est pas substrat.

Résultats

De façon surprenante, le 3-MP est un très bon donneur pour l'ensemble des TST alors que le TS est le moins bon donneur pour la TSTD1 et la GlpE. En effet, pour ces deux TST, l'efficacité catalytique est de 46 à 170 fois supérieure en présence de 3-MP par rapport à celle déterminée en présence de TS. Par contre, le TS reste un meilleur substrat que le 3-MP pour la Rhodanèse avec une efficacité catalytique 20 fois supérieure à celle déterminée en présence de 3-MP ($2,1 \cdot 10^5$ vs. $4,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figure 58, Tableau 4).

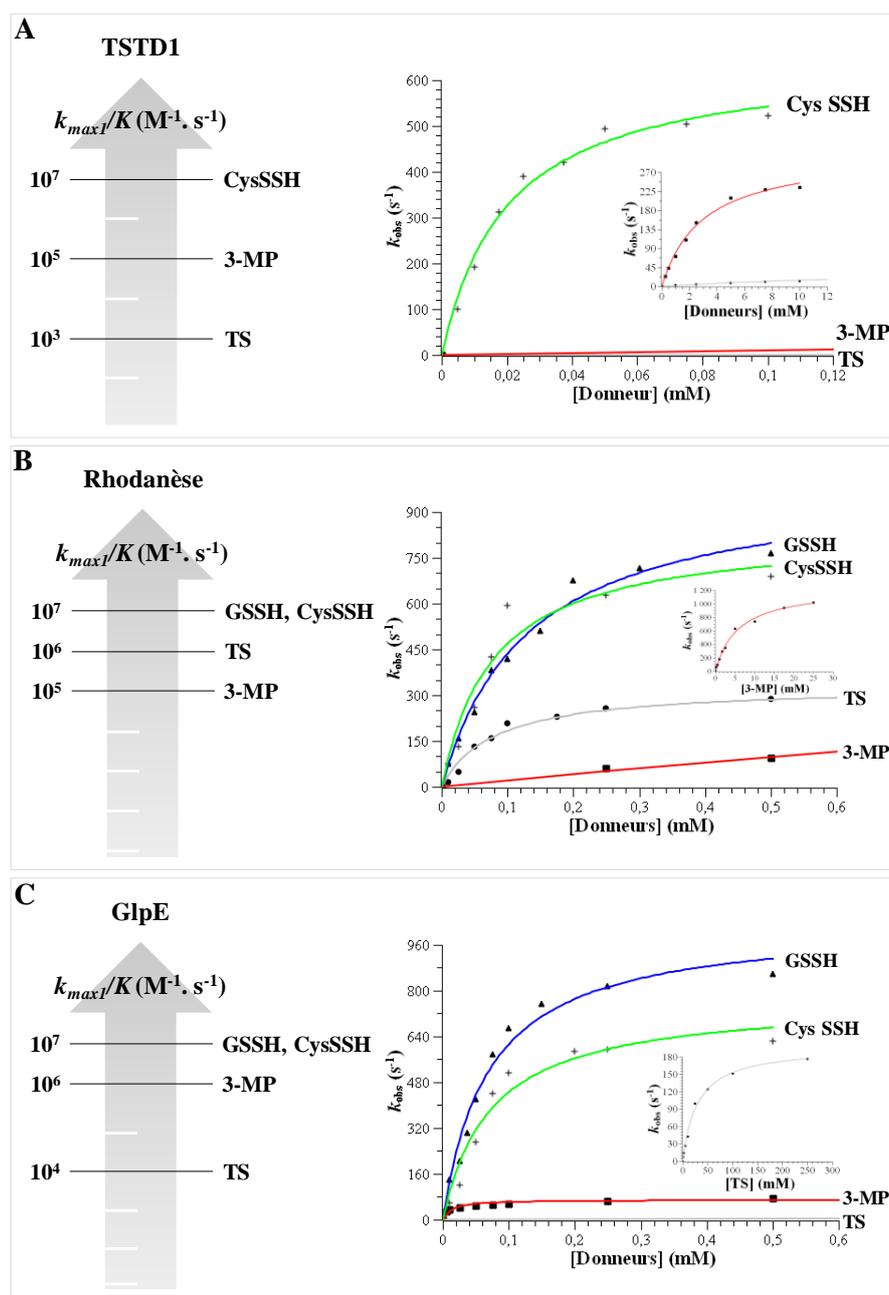


Figure 58. Étude de la spécificité de substrat donneur de soufre pour les TST humaine TSTD1 (A) et Rhodanèse (B) et de la GlpE d'*E. coli* (C) via l'étude de la première étape.

Graphique $k_{\text{obs}} = f([\text{donneur}])$ pour la TSTD1 (A), Rhodanèse (B) et la GlpE (C). Les données expérimentales (+), (▲), (■) et (●), correspondant respectivement aux k_{obs} mesurés en présence de CysSSH, GSSH, 3-MP et TS, ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la première étape k_{max1} et la constante d'affinité apparente K pour le substrat testé.

Tableau 4. Paramètres cinétiques de la première étape catalysée par les TST en présence de différents substrats donneurs de soufre.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque des TST liée à la formation de l'intermédiaire persulfure. ^(a) Pas d'activité détectée ($k_{\max} < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

<i>TSTD1</i>	<i>Première étape</i>		
	$k_{\max1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K \text{ (mM)}$	$k_{\max1}/K \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$
3-MP	318 ± 13	3,0 ± 0,3	1,1.10 ⁵
TS	43 ± 3	18 ± 4	2,4.10 ³
GSSH	(a)	(a)	(a)
CysSSH	652 ± 32	0,020 ± 0,003	3,3.10 ⁷
<i>Rhodanese</i>	$k_{\max1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K \text{ (mM)}$	$k_{\max1}/K \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$
3-MP	1246 ± 43	5,9 ± 0,5	2,1.10 ⁵
TS	331 ± 15	0,080 ± 0,012	4,1.10 ⁶
GSSH	1006 ± 56	0,131 ± 0,018	7,7.10 ⁶
CysSSH	837 ± 90	0,079 ± 0,024	1,1.10 ⁷
<i>GlpE</i>	$k_{\max1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K \text{ (mM)}$	$k_{\max1}/K \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$
3-MP	79 ± 2	0,068 ± 0,014	1,2.10 ⁶
TS	199 ± 6	28 ± 4	7,1.10 ³
GSSH	1039 ± 57	0,070 ± 0,011	1,5.10 ⁷
CysSSH	750 ± 67	0,069 ± 0,019	1,1.10 ⁷

II. Spécificités de substrats accepteurs de soufre

1) Les 3-MST

Par rapport aux autres accepteurs à thiol (L-Cys, DHLA, GSH), la Trx est le meilleur substrat pour la ^{h3}-MST avec une efficacité catalytique ($k_{\max2}/K$) de 74 à 640 fois plus élevée avec un effet majoritairement affinité apparente K (Figure 59, Tableau 5). C'est sans doute également le cas pour la ^{Ec3}-MST bien que les paramètres cinétiques de la deuxième étape n'aient pu être déterminés en présence de Trx, du fait de la limite de la technique utilisée. Cependant et de manière inattendue, le sulfite est le meilleur accepteur pour les 3-MST avec une efficacité catalytique supérieure d'un facteur 7 à celle obtenue en présence de Trx pour la ^{h3}-MST ($6,5.10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs. $9,6.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et une valeur de $6,8.10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la ^{Ec3}-MST. Pour cette dernière, la réaction étant plus rapide (facteur environ 13 sur le k_{obs} à 200 μM) que pour l'enzyme humaine, aucune saturation n'a pu être observée sur la gamme de concentration testée (Figure 59, panel D). Enfin, H₂S est également accepteur pour la ^{h3}-MST avec une efficacité catalytique similaire à celles déterminées pour les substrats à thiols à l'exception de la Trx.

Résultats

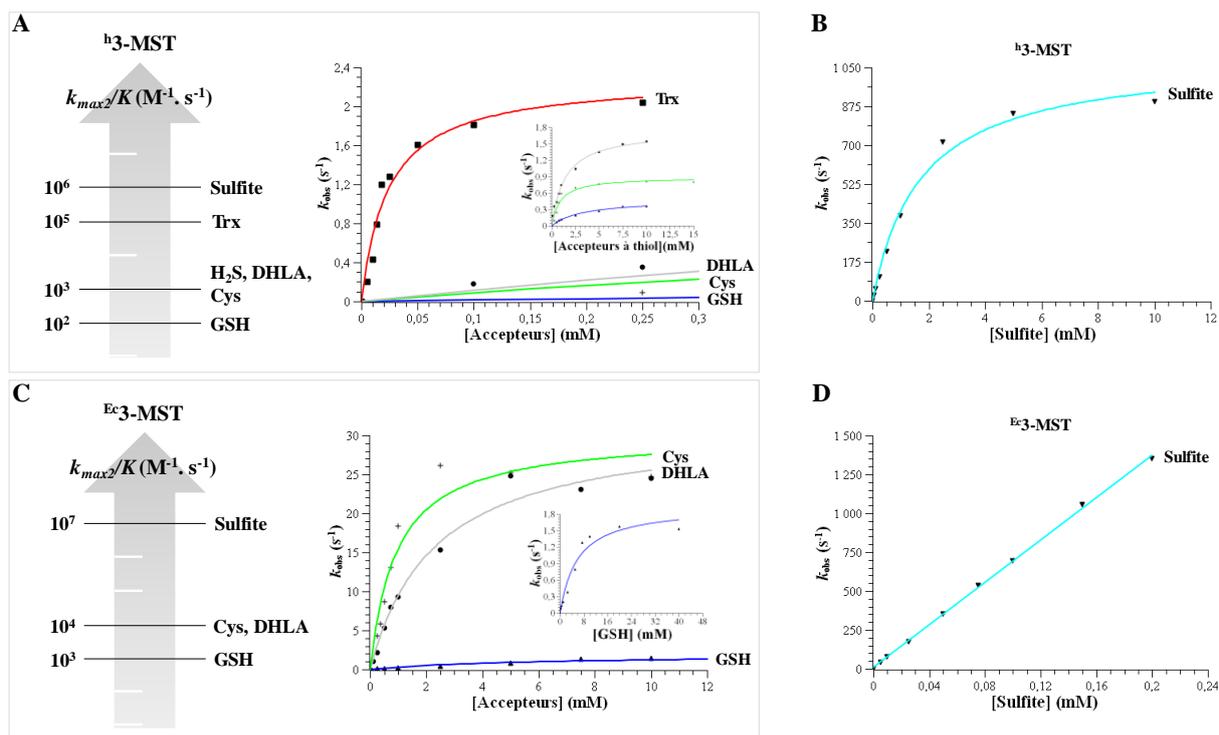


Figure 59. Étude de la spécificité de substrat accepteur de soufre pour les 3-MST humaine (A et B) et d'*E. coli* (C et D) par l'étude de la deuxième étape.

Graphique $k_{\text{obs}} = f([\text{accepteur}])$ pour la $h^3\text{-MST}$ (A et B) et la $Ec^3\text{-MST}$ (C et D). Les données expérimentales (+), (\blacktriangle), (\bullet), (\blacksquare) et (\blacktriangledown), correspondant respectivement aux k_{obs} mesurés en présence de Cys, GSH, DHLA, Trx et sulfite, ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la deuxième étape $k_{\text{max}2}$ et la constante d'affinité apparente K pour le substrat testé.

Tableau 5. Paramètres cinétiques de la deuxième étape catalysée par les 3-MST en présence de différents substrats accepteurs de soufre.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque des TST liée au passage de l'intermédiaire persulfure à la forme thiol de la cystéine catalytique. (a) Non déterminable, (b) pas de saturation observée, et (c) non testé.

$Ec^3\text{-MST}$	Deuxième étape		
	$k_{\text{max}2}$ (s^{-1})	K (mM)	$k_{\text{max}2}/K$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Trx	> 20	(a)	(a)
Sulfite	(b)	(b)	$6,8 \cdot 10^6$
L-Cys	30 ± 3	$0,95 \pm 0,25$	$3,2 \cdot 10^4$
DHLA	32 ± 2	$2,3 \pm 0,4$	$1,4 \cdot 10^4$
GSH	$2,1 \pm 0,2$	6 ± 2	$3,5 \cdot 10^2$
3-MP	(c)	(c)	(c)

$h^3\text{-MST}$	Deuxième étape		
	$k_{\text{max}2}$ (s^{-1})	K (mM)	$k_{\text{max}2}/K$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Trx	$2,3 \pm 0,2$	$0,024 \pm 0,005$	$9,6 \cdot 10^4$
Sulfite	1100 ± 50	$1,7 \pm 0,2$	$6,5 \cdot 10^5$
L-Cys	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$	$1 \cdot 10^3$
DHLA	$1,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \cdot 10^3$
GSH	$0,5 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,5$	$1,5 \cdot 10^2$
H ₂ S	33 ± 1	$5,9 \pm 0,7$	$5,6 \cdot 10^3$
3-MP	(c)	(c)	(c)

2) Les TST

Contrairement aux 3-MST, la Trx est un très mauvais accepteur pour les TST (pas d'activité détectée pour la TSTD1 et la Rhodanèse, et efficacité catalytique très faible de $30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la GlpE). Parmi les autres accepteurs à thiol (L-Cys, DHLA, GSH), la spécificité de substrat diffère d'une TST à l'autre avec une absence de sélectivité pour la GlpE (efficacité catalytique de $2 \cdot 10^4$ à $9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), une préférence pour le DHLA pour la TSTD1 (facteur d'au moins 440) et une absence totale d'activité en présence de GSH pour la Rhodanèse (Figure 60).

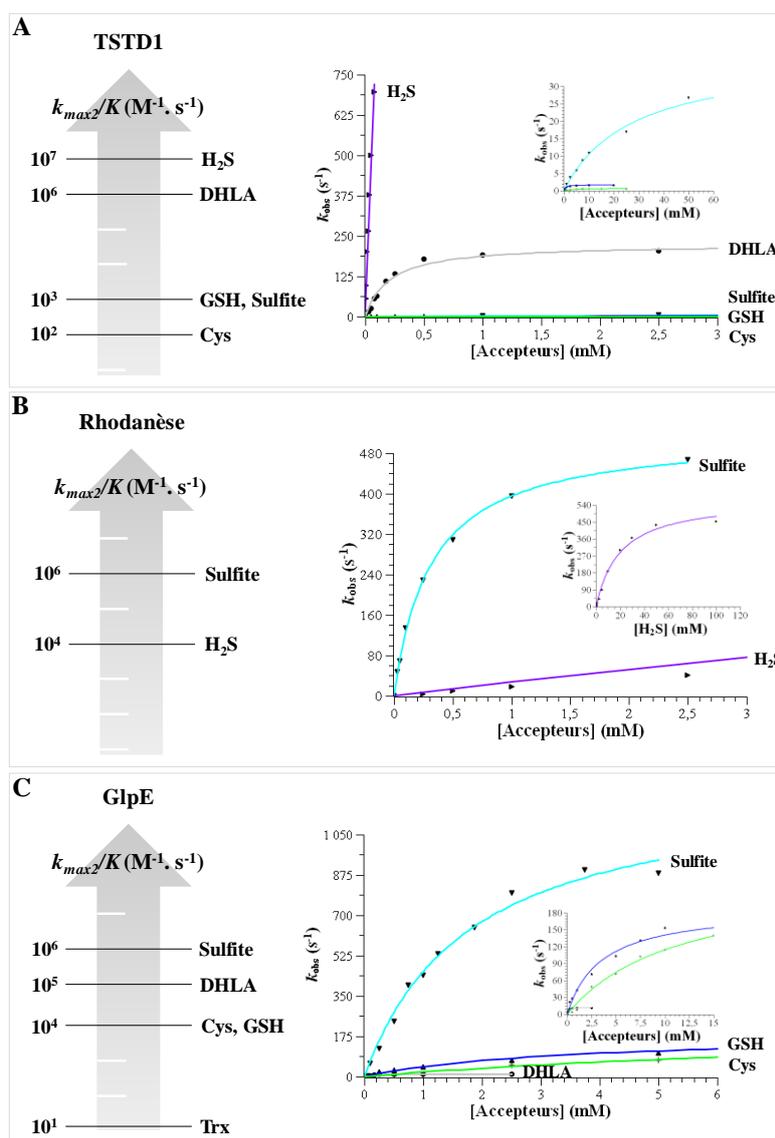


Figure 60. Etude de la spécificité de substrat accepteur de soufre pour les TST humaines TSTD1 (A) et Rhodanèse (B) et d'E. coli GlpE (C) par l'étude de la deuxième étape.

Graphique $k_{obs} = f([\text{accepteur}])$ pour la TSTD1 (A), la Rhodanèse (B) et la GlpE (C). Les données expérimentales (\blacktriangle), (\bullet), ($+$), (\blacktriangledown) et (\blacktriangleright), correspondant respectivement aux k_{obs} mesurés en présence de GSH, DHLA, Cys, sulfite et H₂S, ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) ce qui permet de déterminer la constante de vitesse maximale de la deuxième étape k_{max2} et la constante d'affinité apparente K pour le substrat testé.

Résultats

Par contre, le sulfite est un très bon accepteur pour la Rhodanèse et la GlpE (efficacités catalytiques de $1,6 \cdot 10^6$ et $8,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui n'est pas le cas pour la TSTD1 ($1,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Enfin, H_2S est un bon voire très bon accepteur pour les TST humaines (efficacités catalytiques de $2,9 \cdot 10^4$ à $9,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) alors qu'aucune activité n'est détectée pour la GlpE (Tableau 6).

Tableau 6. Paramètres cinétiques de la deuxième étape catalysée par les TST en présence de différents substrats accepteurs de soufre.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque des TST liée au passage de l'intermédiaire persulfure à la forme thiol de la cystéine catalytique. ^(a) Pas d'activité détectée ($k_{\text{max}} < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), ^(b) pas de saturation observée, et ^(c) non déterminable.

<i>TSTD1</i>	<i>Deuxième étape</i>		
	$k_{\text{max}2} (\text{s}^{-1})$ (a)	<i>K</i> (mM) (a)	$k_{\text{max}2}/K (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ (a)
Trx			
Sulfite	39 ± 2	30 ± 5	$1,3 \cdot 10^3$
L-Cys	$0,70 \pm 0,04$	$3,7 \pm 0,9$	$1,9 \cdot 10^2$
GSH	$1,71 \pm 0,05$	$0,684 \pm 0,088$	$2,5 \cdot 10^3$
DHLA	225 ± 9	$0,202 \pm 0,026$	$1,1 \cdot 10^6$
H₂S	(b)	(b)	$9,4 \cdot 10^6$
<i>Rhodanèse</i>	$k_{\text{max}2} (\text{s}^{-1})$ (a)	<i>K</i> (mM) (a)	$k_{\text{max}2}/K (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ (a)
Trx			
Sulfite	520 ± 9	$0,316 \pm 0,016$	$1,6 \cdot 10^6$
L-Cys	(c)	(c)	(c)
GSH	(a)	(a)	(a)
DHLA	(c)	(c)	(c)
H₂S	576 ± 29	$19,9 \pm 2,7$	$2,9 \cdot 10^4$
<i>GlpE</i>	$k_{\text{max}2} (\text{s}^{-1})$ (b)	<i>K</i> (mM) (b)	$k_{\text{max}2}/K (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ (b)
Trx			$3 \cdot 10^1$
Sulfite	1275 ± 64	$1,5 \pm 0,3$	$8,4 \cdot 10^5$
L-Cys	187 ± 9	$3,8 \pm 0,8$	$4,9 \cdot 10^4$
GSH	234 ± 13	8 ± 1	$2,9 \cdot 10^4$
DHLA	$12,8 \pm 0,7$	$0,143 \pm 0,025$	$9 \cdot 10^4$

III. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire

Les paramètres cinétiques ont été déterminés grâce au système couplé NTR/NADPH quand la Trx est l'accepteur de soufre et avec la sonde à H_2S lorsqu'il s'agit d'un autre substrat à thiol. D'autre part, l'activité de transformation du sulfite en thiosulfate a été étudiée par quantification du sulfite résiduel en utilisant le système couplé sulfite oxydase/NADH peroxydase (kit k-ETSULPH, Megazyme International, Irlande). Avant quantification, la réaction a été stoppée par ajout d'acétate d'éthyle pour la ^{h3}-MST ou d'urée pour les TST.

L'interprétation des valeurs des paramètres cinétiques à l'état stationnaire en termes d'efficacité catalytique et de spécificité de substrat n'est pas pertinente sans connaître la nature de l'étape cinétiquement limitante.

1) Les 3-MST

Dans le cas de la ^{Ec}3-MST, l'utilisation d'accepteurs à thiol différents de la Trx conduit à une diminution du k_{cat} d'un facteur 3 à 73. Les valeurs de k_{cat} étant similaires aux valeurs des constantes k_{max2} , la seconde étape de transfert de soufre est donc limitante.

Pour la ^h3-MST en présence 3-MP, aucune variation significative du k_{cat} n'est observée sauf en présence de sulfite avec une augmentation d'un facteur 1000. Ceci montre que, de façon surprenante, l'étape de libération du pyruvate est au moins 1000 fois plus rapide mais cet effet « accélérateur » du sulfite reste à être expliquer (Figure 61, Tableau 7).

Tableau 7. Paramètres cinétiques obtenus à l'état stationnaire pour les 3-MST.

(a) Pas d'activité détectée ($k_{cat} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). (b) Non testé. * Les coefficients de Hill (n) ont été obtenus après ajustement des données expérimentales à l'équation de Hill (Équation 2) et les valeurs de K_M correspondantes sont des $K_{0,5}$.

^{Ec} 3-MST		Etat stationnaire			
Partenaire	Substrat testé	$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (mM)}$	$k_{cat}/K_M \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	
Trx	3-MP	110 ± 5	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \cdot 10^5$	
	TS	(a)	(a)	(a)	
3-MP	Trx	110 ± 5	$0,024 \pm 0,004$	$4,6 \cdot 10^6$	
	Sulfite	(b)	(b)	(b)	
	L-Cys	18 ± 2	5 ± 1	$3,6 \cdot 10^3$	
	DHLA	36 ± 4	5 ± 1	$7,2 \cdot 10^3$	
	GSH	$1,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$2,1 \cdot 10^3$	
	3-MP	$0,67 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$	$5,2 \cdot 10^2$	* $4,2 \pm 0,3$
^h 3-MST					
Partenaire	Substrat testé	$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (mM)}$	$k_{cat}/K_M \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	
Trx	3-MP	$0,37 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,1$	$2,2 \cdot 10^2$	* $1,7 \pm 0,1$
	TS	$0,019 \pm 0,001$	23 ± 1	0,8	* $1,9 \pm 0,1$
3-MP	Trx	$0,37 \pm 0,01$	$0,047 \pm 0,005$	$7,9 \cdot 10^3$	* $1,8 \pm 0,1$
	Sulfite	358 ± 26	$0,738 \pm 0,202$	$4,9 \cdot 10^5$	
	L-Cys	$0,78 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,1$	$2 \cdot 10^3$	
	DHLA	$0,58 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,1$	$4,5 \cdot 10^2$	
	GSH	$0,54 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,2$	$3,9 \cdot 10^2$	
	3-MP	$0,75 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,1$	$3,4 \cdot 10^2$	* $3,4 \pm 0,1$

Résultats

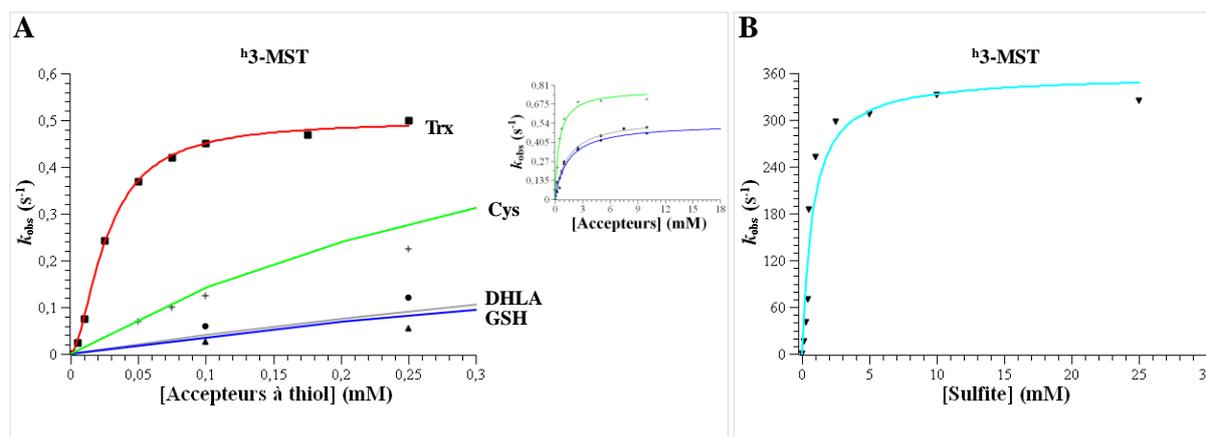


Figure 61. Étude à l'état stationnaire de la réaction catalysée par la h3-MST en présence de différents substrats.

A: Graphe $k_{obs} = f([\text{accepteur}])$. Les données expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (Cys, + ; GSH, ▲ et DHLA, ●) (Équation 1) ou à l'équation de Hill (Trx, ■) (Équation 2).

B : Graphe $k_{obs} = f([\text{sulfite}])$. Les données expérimentales (▼), correspondant aux k_{obs} mesurés en présence de sulfite, ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole permettant la détermination du k_{cat} et du K_M pour le sulfite.

2) Les TST

En ce qui concerne la TSTD1 et la GlpE (résultat non montré), nous avons montré que l'étape de libération du pyruvate était cinétiquement limitante en présence de 3-MP, et il en est sans doute de même pour la Rhodanèse. Par conséquent, cette étape est respectivement 142 fois et 18 fois plus rapide pour la Rhodanèse que pour la TSTD1 et la GlpE (Figure 62, Tableau 8).

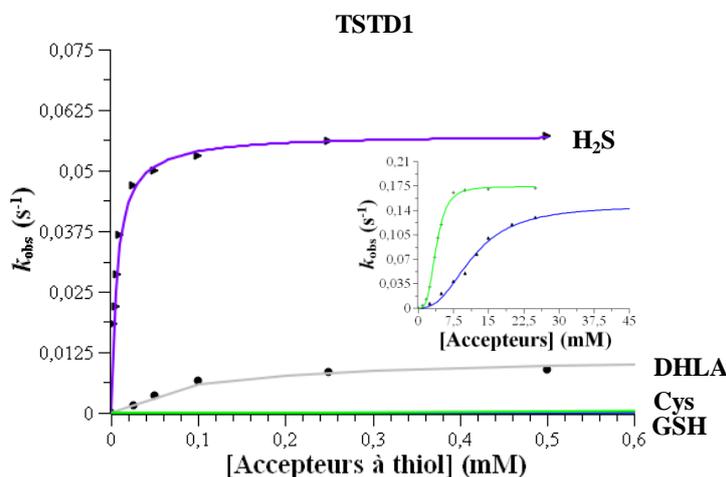


Figure 62. Étude à l'état stationnaire de la réaction catalysée par la TSTD1 en présence de différents substrats.

Graphe $k_{obs} = f([\text{accepteur}])$. Les données expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une hyperbole (H₂S, ▶ et DHLA, ●) (Équation 1) ou à l'équation de Hill (Cys, + et GSH ▲) (Équation 2).

Pour la TSTD1 et la GlpE en présence de TS, les constantes de vitesse k_{max1} et k_{max2} étant largement supérieures au k_{cat} , l'étape cinétiquement limitante de la réaction globale n'est pas associée à ces processus de transfert de soufre mais à la libération des produits, à la

formation d'H₂S, ou encore à des changements conformationnels associés. Le fait qu'une augmentation du k_{cat} d'un facteur 10 soit observée en présence d'un accepteur dithiol par rapport à un monothiol (0,15 vs. 1,5 s⁻¹ pour la TSTD1, Tableau 8) indique que l'étape limitante n'est pas associée à la libération du sulfite (premier produit de la réaction) mais probablement à la décomposition de l'accepteur sous forme persulfure en H₂S.

Tableau 8. Paramètres cinétiques obtenus à l'état stationnaire pour les TST.

(^a) Pas d'activité détectée ($k_{cat} < 10^{-4}$ s⁻¹). (^b) Non testé. * Les coefficients de Hill (n) ont été obtenus après ajustement des données expérimentales à l'équation de Hill (Équation 2) et les valeurs de K_M correspondantes sont des $K_{0,5}$.

<i>TSTD1</i>		<i>Etat stationnaire</i>			
Partenaire	Substrat testé	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ . s ⁻¹)	
GSH	3-MP	0,025 ± 0,002	13 ± 2	1,9	* 1,4 ± 0,2
	TS	0,15 ± 0,01	95 ± 8	1,6	* 1,7 ± 0,2
DHHLA	GSSH	(^a)	(^a)	(^a)	
	CysSSH	2,6 ± 0,1	5,9 ± 0,3	4,4.10 ²	* 2,8 ± 0,4
TS	Trx	(^a)	(^a)	(^a)	
	Sulfite	(^b)	(^b)	(^b)	
	L-Cys	0,17 ± 0,01	3,9 ± 0,1	44	* 3,5 ± 0,2
	GSH	0,15 ± 0,01	11,7 ± 0,6	13	* 2,6 ± 0,3
	H ₂ S	0,058 ± 0,001	0,0066 ± 0,0005	8,8.10 ³	
	DHHLA	1,5 ± 0,04	14,5 ± 0,6	1,0.10 ²	* 2,8 ± 0,2
3-MP	DHHLA	0,012 ± 0,001	0,102 ± 0,014	1,2.10 ²	
<i>Rhodanèse</i>					
Partenaire	Substrat testé	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ . s ⁻¹)	
DHHLA	3-MP	2,7 ± 0,1	6,6 ± 1,1	4,1.10 ²	
	TS	0,50 ± 0,02	0,233 ± 0,018	5,2.10 ³	* 1,3 ± 0,1
	GSSH	0,70 ± 0,02	0,142 ± 0,006	4,9.10 ³	* 2,0 ± 0,1
	CysSSH	3,0 ± 0,2	0,035 ± 0,007	8,6.10 ⁴	
GSSH	Sulfite	39 ± 1	0,653 ± 0,044	6.10 ⁴	
	Trx	(^a)	(^a)	(^a)	* 1,9 ± 0,3
TS	L-Cys	4,2 ± 0,2	37,5 ± 3,0	1,1.10 ²	* 1,8 ± 0,2
	GSH	(^a)	(^a)	(^a)	
	DHHLA	0,50 ± 0,02	0,255 ± 0,050	1,6.10 ³	
	H ₂ S	0,064 ± 0,003	0,010 ± 0,001	6,4.10 ³	
<i>GlpE</i>					
Partenaire	Substrat testé	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ . s ⁻¹)	
GSH	3-MP	0,15 ± 0,01	33 ± 2	4,5	* 2,1 ± 0,1
	TS	0,60 ± 0,02	61 ± 7	10,5	
DHHLA	GSSH	3,7 ± 0,1	0,060 ± 0,002	6,2.10 ⁴	* 3,2 ± 0,4
	CysSSH	3,9 ± 0,3	7,6 ± 1,3	5,1.10 ²	
TS	Trx	0,0043 ± 0,0002	0,06 ± 0,002	72	* 2,8 ± 0,3
	Sulfite	(^b)	(^b)	(^b)	
	L-Cys	0,3 ± 0,01	7,5 ± 0,6	40	* 2,0 ± 0,3
	GSH	0,60 ± 0,02	12 ± 1	43	* 2,7 ± 0,4
	DHHLA	2,9 ± 0,1	4,6 ± 0,4	6,3.10 ²	* 2,8 ± 0,6
3-MP	DHHLA	0,49 ± 0,01	0,110 ± 0,01	4,5.10 ³	

Chapitre IV. Etude préliminaire du complexe SOU

Au niveau physiologique, il est proposé que les TST humaines interviennent dans le mécanisme mitochondrial d'élimination d'H₂S de par leur implication dans la formation du complexe SOU (voir paragraphe II-3) du chapitre I de l'introduction). Bien qu'il soit admis que la sulfure quinone oxydoréductase et ETHE1 soient présents dans ce complexe, l'identité du troisième partenaire (TSTD1 ou Rhodanèse) et la voie d'oxydation des sulfures restent à clarifier. D'autre part, nous avons montré que la ^h3-MST, localisée également dans la mitochondrie, présente une activité type TST. Sa participation au complexe SOU ne pouvait donc pas être écartée.

Dans ce contexte, la formation *in vitro* de complexes binaires entre ETHE1 et l'une des trois sulfurtransférases mitochondriales humaines, c'est-à-dire Rhodanèse, TSTD1 et ^h3-MST, a été évaluée par « quenching » et anisotropie de fluorescence. Au préalable, il était indispensable de produire et purifier ETHE1 sous forme active.

1) Production/purification d'ETHE1 sous forme active

ETHE1 a été produite sous forme soluble à partir d'un vecteur pET28b ETHE1 dans des cellules BL21 (DE3). Le vecteur pET28b ETHE1 a été obtenu par sous-clonage, dans le pET28b, de la séquence codante optimisée pour la production hétérologue dans l'hôte *E. coli* (GeneArt®, ThermoFisher Scientific). Le sous-clonage orienté *NcoI/SacI* conduit à la production d'une protéine sans étiquette 6xHis. Le protocole de purification se compose de : (1) une lyse cellulaire par sonication permettant de récupérer l'enzyme dans la fraction soluble, (2) une précipitation à 65% de saturation en sulfate d'ammonium, (3) une chromatographie par interaction hydrophobe Phényl-Sepharose (l'enzyme est éluée à une concentration de 0 mM en SA) et (4) une chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose (élution à 235 mM de KCl). Un tableau récapitulatif des différentes étapes de la purification ainsi qu'un gel SDS-PAGE représentatif sont présentés Figure 63. Ce protocole permet d'obtenir la forme sauvage d'ETHE1 purifiée à homogénéité avec un rendement de l'ordre de 10 mg/L de culture.

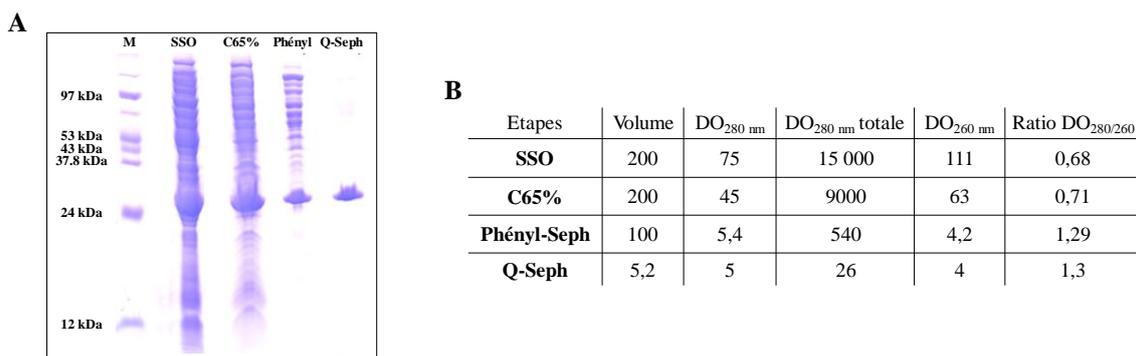


Figure 63. Analyse des étapes de purification de ETHE1 par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE 12,5% (A). Tableau récapitulatif de la purification de ETHE1 (B).

La purification a été réalisée à partir de 4 litres de culture de cellules d’*E. coli* BL21 (DE3) en milieu LB/K. M : marqueur de taille contenant l’ARN polymérase T7 (97 kDa), la rétinol déshydrogénase (53 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la GAPDH (37,8 kDa), la MsrA (24 kDa) et la Trx (12 kDa). SSO : surnageant de sonication, C65% : culot de précipitation à 65% de saturation en SA, Phényl : éluât de la colonne Phényl-Sepharose, Q-Seph : éluât de la colonne Q-Sepharose.

Avant d’entreprendre l’étude des complexes binaires, il était nécessaire de vérifier que l’ETHE1 recombinante était active. Cette enzyme catalyse la transformation O₂-dépendante du GSSH en sulfite et GSH, son activité a donc été déterminée par le suivi de la disparition de l’O₂ en fonction du temps par utilisation d’une électrode spécifique (Micro dissolved oxygen electrode, Lazar Research Laboratories, INC.). Les paramètres cinétiques ont été déterminés en présence de concentrations variables de GSSH, la concentration en O₂ dans le milieu réactionnel étant considérée saturante (Figure 64).

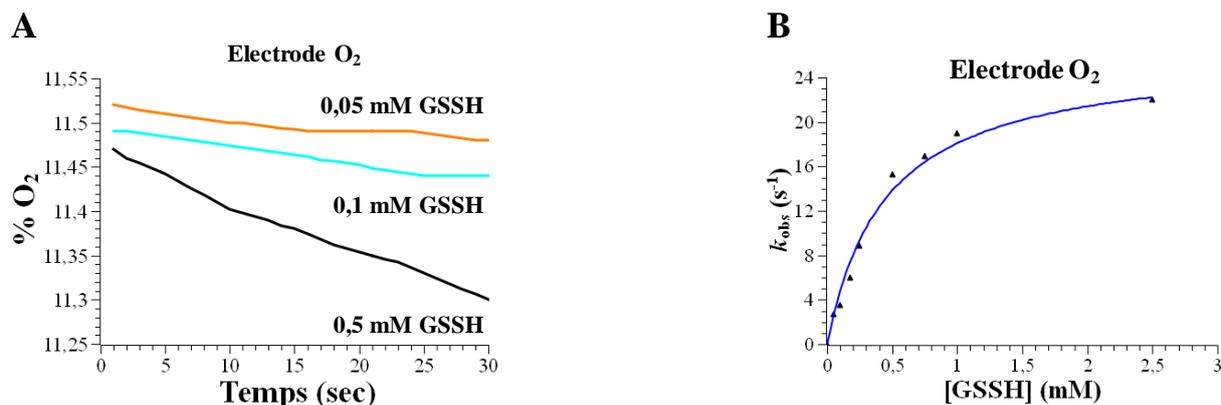


Figure 64. Etude de l’activité enzymatique d’ETHE1 et détermination de ses paramètres cinétiques à l’état stationnaire.

A : Mesure de la vitesse initiale de la réaction catalysée par ETHE1 en présence 10 μM d’ETHE1 puis de 0,05, 0,25 et 0,5 mM de GSSH pour respectivement les traces orange, cyan et noire. Le pourcentage d’O₂ est convertit en concentration molaire par l’utilisation de l’Équation 5.

B : Graphique $k_{obs} = f([GSSH])$. Les données expérimentales (▲) ont été ajustées à l’équation d’une hyperbole (Équation 1) ce qui permet de déterminer une constante catalytique k_{cat} de $26 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ et la constante K_M de $0,45 \pm 0,07 \text{ mM}$ pour le GSSH.

Résultats

L'ajustement des données expérimentales à l'équation de Michaelis-Menten (Équation 1) a permis de déterminer une valeur de $0,45 \pm 0,07$ mM pour le K_M du GSSH et de 26 ± 2 s⁻¹ pour le k_{cat} . La forme recombinante d'ETHE1 est donc active, les paramètres cinétiques à l'état stationnaire étant proches de ceux décrits dans la littérature ($k_{cat} = 47$ s⁻¹ et $K_M = 0,34$ mM) (Kabil et Banerjee, 2012).

2) Etude des interactions entre ETHE1 et les thioltransférases humaines

a) *Quenching de fluorescence*

Cette technique est basée sur l'exploitation de la fluorescence des résidus Trp des protéines et sur l'existence d'une extinction du message de fluorescence (« quenching ») de la protéine lors de la formation du complexe binaire. ETHE1 étant dépourvue de résidus Trp, c'est la variation de l'émission de fluorescence des protéines partenaires qui a été mesurée lors de l'ajout de quantités croissantes d'ETHE1 (Figure 65).

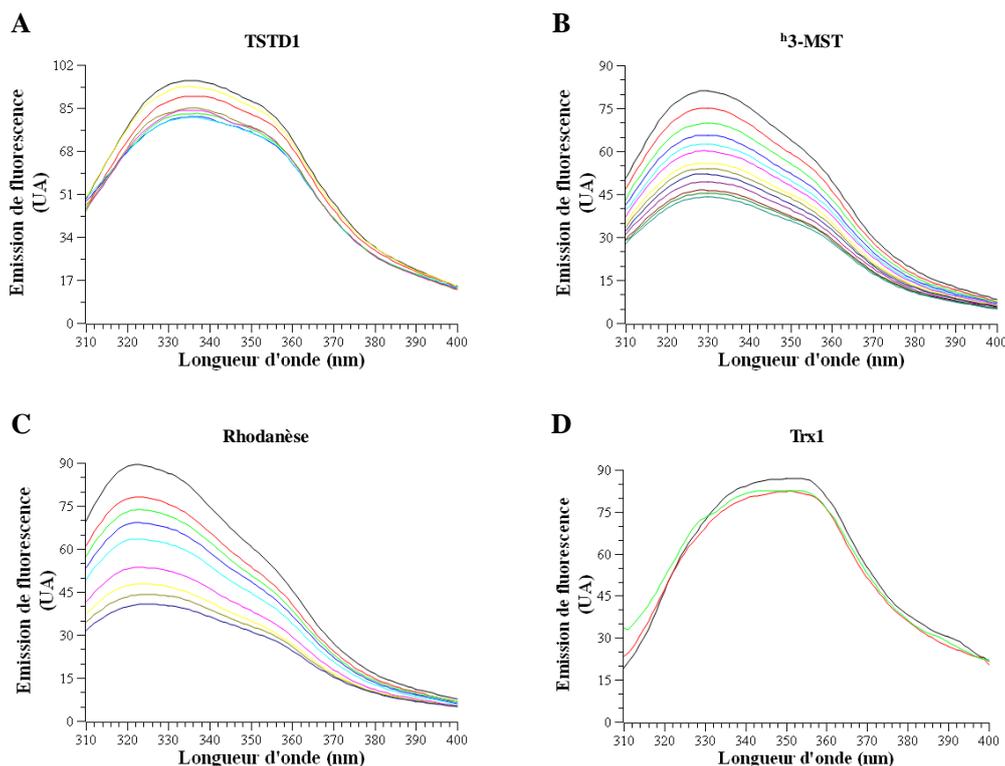


Figure 65. Evolution des spectres d'émission de fluorescence des thioltransférases TSTD1 (A), h3-MST (B), Rhodanèse (C) et de la Trx (D) en présence d'ETHE1.

(A) Spectre obtenu pour 10 μ M de TSTD1 en absence (trace noire) et en présence de concentrations croissantes d'ETHE1 avec un PM de 700V (traces colorées). (B) Spectre obtenu pour 1 μ M de 3-MST en absence (trace noire) et en présence de concentrations croissantes d'ETHE1 avec un PM de 650V. (C) Spectre obtenu pour 5 μ M de Rhodanèse en absence (trace noire) et en présence de concentrations croissantes d'ETHE1 avec un PM de 590V. (D) Spectre obtenu pour 5 μ M de Trx1 d'*E. coli* en absence (trace noire) et en présence de concentrations croissantes d'ETHE1 (0, 10 et 20 μ M pour respectivement les traces noire, verte et rouge) avec un PM de 825V.

Les concentrations utilisées étaient de 5 μM pour la TSTD1 et la Rhodanèse, 1 μM pour la $^{\text{h}}3\text{-MST}$ (10 μM pour la Trx utilisée comme contrôle négatif) et de 15 à 45 μM pour les concentrations maximales d'ETHE1.

Comme montré dans la Figure 65, les quatre protéines testées présentent toutes après excitation à 295 nm un spectre d'émission de fluorescence avec une longueur d'onde maximale d'émission proche de 325/330 nm pour les thioltransférases et 340/350 nm pour la Trx. De plus, une diminution de ce signal après ajout d'ETHE1 a été observée sauf pour la Trx. L'analyse des variations d'émission de fluorescence à 330 nm pour la TSTD1, 323 nm pour la Rhodanèse et 330 nm pour la $^{\text{h}}3\text{-MST}$ en fonction de la concentration en ETHE1 montre l'existence d'une saturation (Figure 66). L'ajustement de ces données expérimentales à l'équation d'une hyperbole (Équation 16) a permis de déterminer les valeurs des constantes de dissociation (K_D) de 13, 30 et 16 μM respectivement pour la TSTD1, la Rhodanèse et la $^{\text{h}}3\text{-MST}$. Ces résultats suggèrent qu'il existe une interaction spécifique entre ETHE1 et les thioltransférases.

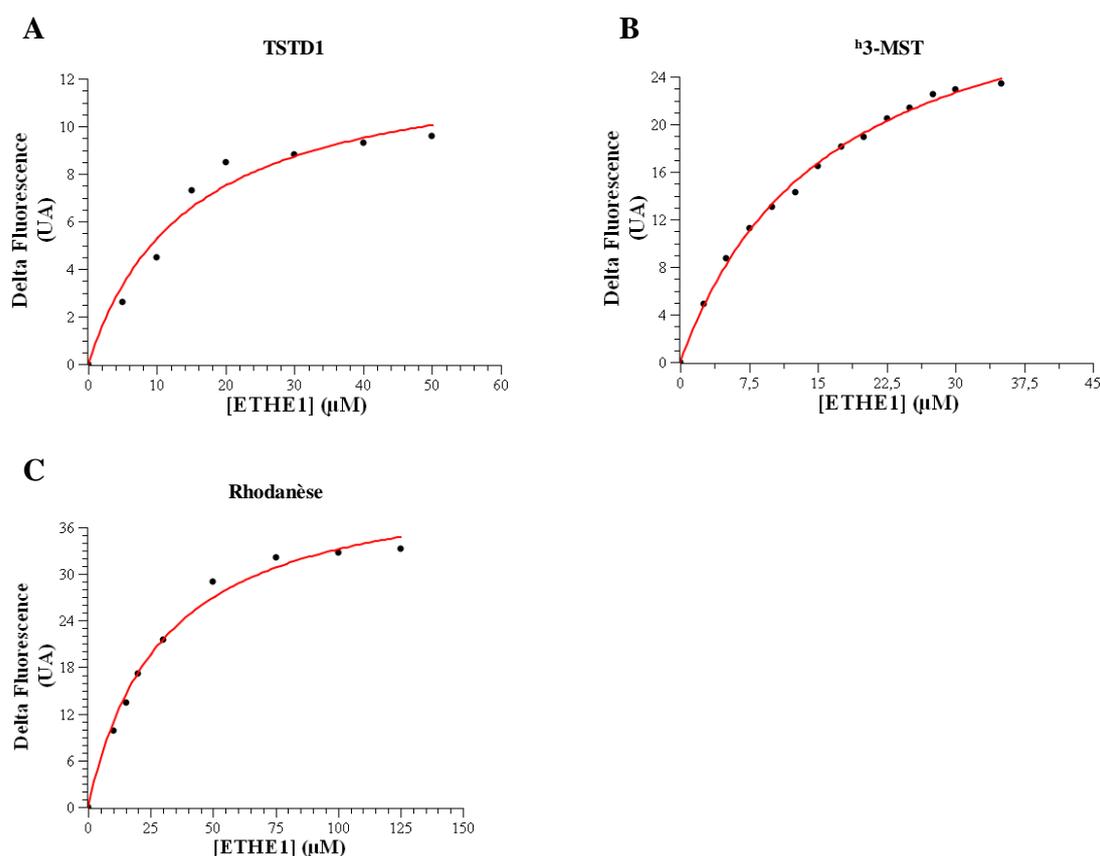


Figure 66. Représentation graphique de l'évolution de l'émission de fluorescence à 325-340 nm en fonction de la concentration en ETHE1 pour la TSTD1 (A), la $^{\text{h}}3\text{-MST}$ (B) et la Rhodanèse (C).

Les points (\bullet) représentent les données expérimentales obtenues par « quenching » de fluorescence ajustées à l'équation d'une hyperbole (Équation 16) via l'utilisation de SciDAVis 1.D013 où F_{max} représente la diminution de la fluorescence maximale et K_D la constante de dissociation. Les différentes valeurs de F_{max} et K_D sont de 15 ± 4 V, 35 ± 1 V et 43 ± 2 V et 13 ± 1 μM , 16 ± 1 μM , 30 ± 3 μM pour respectivement la TSTD1, la $^{\text{h}}3\text{-MST}$ et la Rhodanèse.

Résultats

De plus, la formation de ces complexes est abolie en présence de 100 mM de NaCl, ce qui suggère que les interactions mises en jeu entre les partenaires seraient essentiellement de nature électrostatique (résultats non montrés).

b) Anisotropie de fluorescence

Le « quenching » de fluorescence étant une méthode indirecte, il était indispensable de valider les conclusions précédentes par une approche directe comme l'anisotropie de fluorescence. Puisque les résidus Trp ne sont pas des fluorophores présentant des propriétés adaptées à ces mesures (coefficient d'extinction et rendement quantique faibles, longueur d'onde d'émission trop basse), il était nécessaire de marquer l'une des deux protéines par une sonde fluorescente et de suivre le signal d'anisotropie de fluorescence de la protéine marquée en fonction de l'ajout de quantités croissantes du partenaire non marqué. La valeur d'anisotropie dépendant de la taille de la protéine marquée, la formation d'un complexe avec la protéine non marquée entraîne une augmentation de la taille et donc une augmentation de l'anisotropie. L'idéal est donc de marquer la protéine de plus petite taille de façon à obtenir des variations d'anisotropie importantes entre les formes libre et liée. Cependant, pour des aspects pratiques, nous avons choisi de marquer la protéine ETHE1 (48 kDa vs. 15 kDa pour la TSTD1, 35 kDa pour la Rhodanèse et 35 kDa pour la ^h3-MST).

ETHE1 a donc été marquée par couplage covalent sur une fonction amine avec la sonde fluorescente Alexa Fluor 488 5-SDP ester (Life technologies). Les conditions expérimentales de couplage ont été choisies pour favoriser le marquage de la fonction amine terminale d'ETHE1 (pH 8), et un marquage de 9 à 20 % a été obtenu selon les préparations. L'anisotropie de fluorescence a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et d'émission de 524 nm. Le mélange réactionnel était composé de 0,45 μ M à 1,5 μ M d'ETHE1 marquée (AF-ETHE1), en fonction du pourcentage de marquage obtenu.

La variation de la valeur d'anisotropie de fluorescence d'AF-ETHE1 a été mesurée par titration avec des concentrations croissantes du partenaire et toutes les titrations présentent une augmentation d'anisotropie saturable qui reflète la formation de complexes binaires, sauf celle en présence de Trx (résultats non montrés). Cependant, pour les plus fortes concentrations en Rhodanèse et ^h3-MST (> 50 μ M), une augmentation linéaire de la valeur d'anisotropie était observée reflétant sans doute un phénomène de diffusion de lumière lié à une agrégation

partielle (la lumière diffusée étant totalement polarisée). Une correction a donc été apportée pour tenir compte de cette augmentation « aspécifique » d'anisotropie. Les valeurs d'anisotropie sont ensuite converties en fraction d'AF-ETHE1 sous forme de complexe formé AF-ETHE1/partenaire. Ces données ont ensuite été analysées selon un modèle d'interaction simple à un site suivant une équation hyperbolique (Équation 19) (Figure 67).

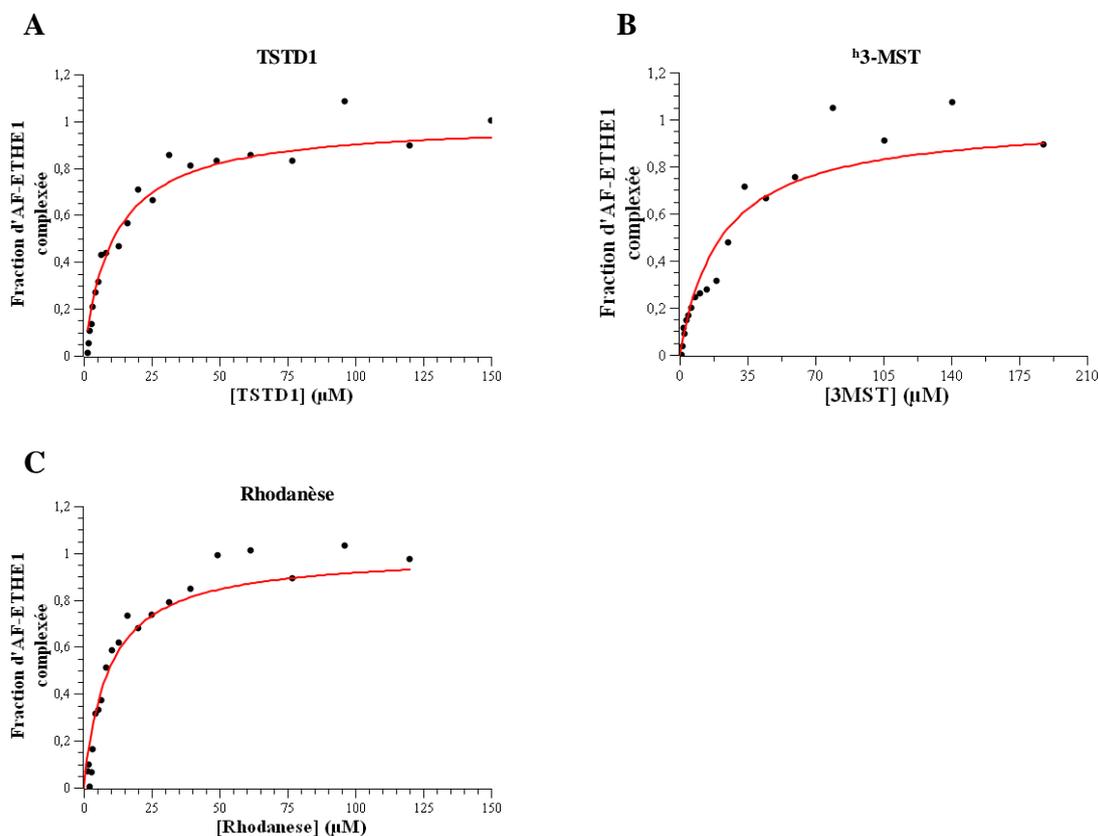


Figure 67. Suivi de la formation du complexe AF-ETHE1/thioltransférase par anisotropie de fluorescence. Les mélanges ont été réalisés en tampon A et après excitation à 495 nm, l'anisotropie de fluorescence a été mesurée à 524 nm. Les données expérimentales ont ensuite été ajustées à l'Équation 19 en utilisant Scidavis 1.D013.
 A : 0,45 μM d'AF-ETHE1 et des concentrations variables en TSTD1 ($K_D = 12 \pm 2$ μM).
 B : 1,5 μM d'AF-ETHE1 et des concentrations variables en Rhodanèse ($K_D = 10 \pm 1$ μM).
 C : 1,5 μM d'AF-ETHE1 et des concentrations variables en ^{h3}-MST ($K_D = 22 \pm 3$ μM).

L'ajustement des données expérimentales à cette équation a permis d'obtenir les valeurs des constantes de dissociation (K_D) de 12 ± 1 , 10 ± 1 et 22 ± 3 μM respectivement pour la TSTD1, la Rhodanèse et la ^{h3}-MST, ce qui confirme bien la formation de complexes spécifiques entre ETHE1 et les thioltransférases. L'influence éventuelle du groupement AF sur la formation des complexes devra être évaluée en réalisant la même étude après marquage des partenaires thioltransférases.

Résultats

Tableau 9. Valeurs des K_D déterminées par « quenching » et anisotropie de fluorescence.

K_D (μM)	TSTD1	^h 3-MST	Rhodanèse
Quenching de Fluorescence	13 \pm 1	16 \pm 1	30 \pm 3
Anisotropie de Fluorescence	12 \pm 2	22 \pm 3	10 \pm 1

L'ensemble des résultats montre qu'il existe une reconnaissance spécifique entre ETHE1 et les thioltransférases, la Trx ne formant pas de complexes caractérisables dans les conditions utilisées. De plus, ETHE1 ne présente aucune spécificité particulière pour une thioltransférase donnée (pas de différence significative entre les valeurs de K_D obtenues, Tableau 9) et les affinités mesurées sont relativement faibles avec des valeurs de K_D de l'ordre de la dizaine de micromolaires. Ces valeurs sont cependant parfaitement compatibles avec la formation d'un complexe transitoire et dynamique comme cela pourrait être le cas pour le complexe SOU.

*Discussion &
Perspectives*

I. Mécanisme catalytique des thioltransférases à domaine rhodanèse

Nous avons montré que les 3-MST et les TST partagent un même mécanisme catalytique de transfert de soufre à 2 étapes impliquant la formation d'un intermédiaire persulfure sur la Cys essentielle. De plus, la première étape de transfert de soufre est très rapide, ce qui implique *a minima* la formation d'un complexe enzyme-substrat compétent, l'activation de la Cys catalytique, et la stabilisation de l'état de transition. Ainsi, dans toutes les thioltransférases, la boucle catalytique est responsable de l'activation de la Cys catalytique par la stabilisation de la forme thiolate grâce à ses groupements NH peptidiques (Figure 68).

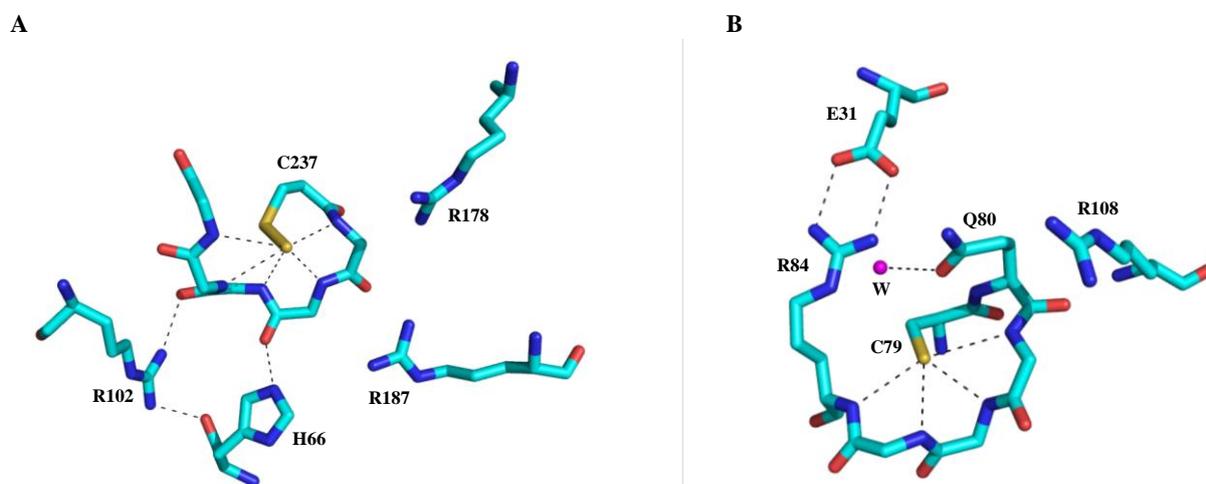


Figure 68. Site actif de la 3-MST (A) et de la TSTD1 (B) humaines.

Les résidus potentiellement impliqués dans la catalyse sont représentés en « boules et bâtons » selon le code couleur suivant : les atomes de soufre sont en jaune, les atomes de carbone en bleu cyan, les atomes d'azote en bleu, les atomes d'oxygène en rouge et la molécule d'eau (W) en violet. Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMol (Shrödinger Inc.).

En présence de 3-MP, un positionnement optimal de sa fonction thiol par rapport à la Cys catalytique est permis par son ancrage dans le site actif grâce aux chaînes latérales des résidus Arg178 et Arg187 dans les 3-MST humaine et d'*E. coli* (pour l'enzyme de *L. major*, l'absence de l'Arg187 pourrait être compensée par l'Arg65) et probablement par le groupement guanidinium de l'Arg107 dans la TSTD1 (résultat préliminaire non montré). La rupture de la liaison C-S requière la déprotonation de la fonction thiol du substrat et l'énolate-pyruvate formé doit être protoné (Figure 69). Pour les 3-MST, l'environnement électrostatique positif généré par la boucle catalytique est à l'origine de l'activation du 3-MP et le proton nécessaire à la formation du pyruvate est issu d'une molécule d'eau dont le mode de stabilisation reste à identifier. Pour la TSTD1, il est fort probable que le mode d'activation du substrat soit similaire

Discussion & Perspectives

et nous avons montré que la Gln80 joue un rôle central dans le positionnement de la molécule d'eau nécessaire à la protonation de l'énolate-pyruvate.

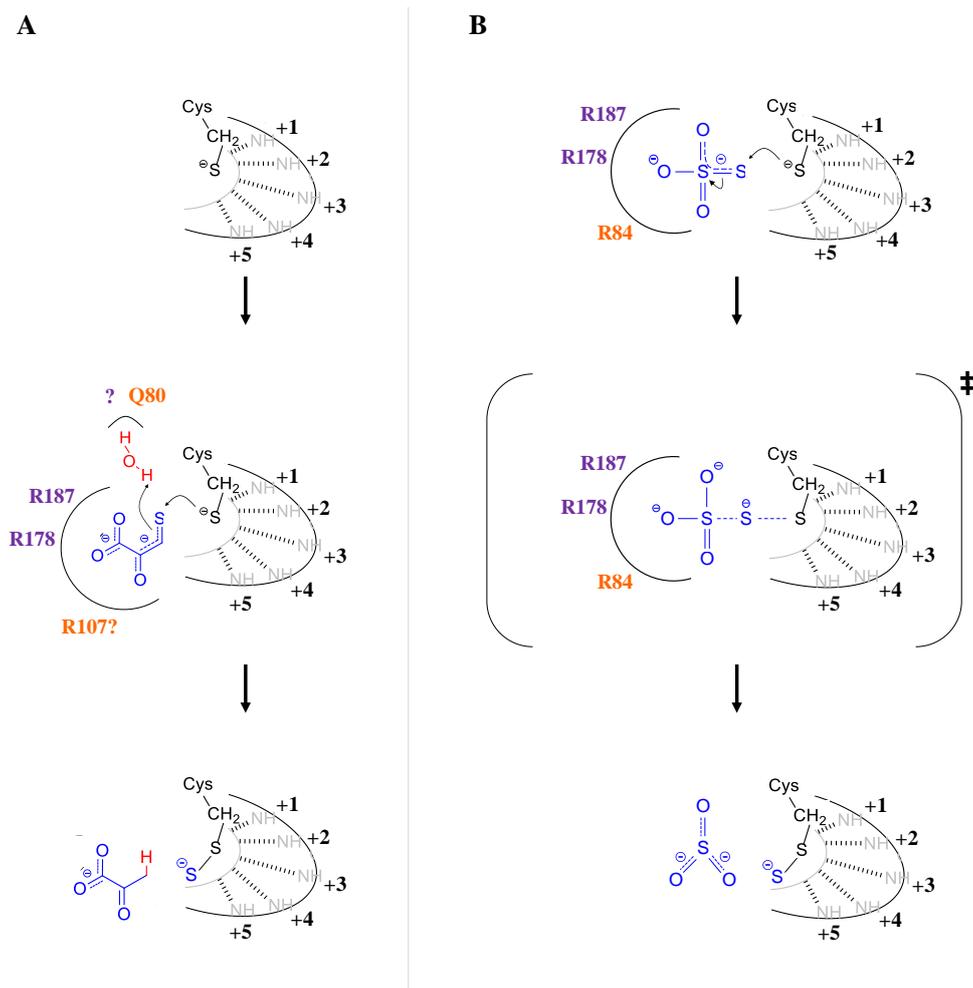


Figure 69. Mécanisme catalytique proposé pour les thioltransférases en présence de 3-MP (A) ou de TS (B) comme donneur.

Hormis la Cys catalytique, les résidus impliqués dans la catalyse sont représentés en violet pour la 3-MST et en orange pour la TSTD1.

Les prérequis à la rupture de la liaison S-S du TS diffèrent en partie de ceux précédemment mentionnés pour le 3-MP, liés notamment à la nature du substrat, qui ne nécessite pas d'activation pour que la réaction de transfert de soufre puisse se faire, et du produit (sulfite), dont la formation est "proton-indépendante". Des études de chimie théorique, réalisées en collaboration avec le Pr. Oscar N. Ventura (Montevideo - Uruguay) sur un modèle TS/thiométhyl (mime de la Cys catalytique), montre que la réaction est spontanée à condition que les charges négatives du TS soient neutralisées (Tableau 10). Dans le cas de la ^h3-MST, les Arg178 et 187 neutralisent les charges au niveau du complexe enzyme-substrat et de l'état de transition. Pour la TSTD1, ce rôle est assuré par la chaîne latérale de l'Arg84 dont le positionnement est assuré par l'établissement d'un pont salin avec le carboxylate du Glu31.

Tableau 10. Variation d'énergie libre calculée pour la réaction modèle TS/thiométhyl (d'après O. Ventura, communication personnelle).

Représentation TS	Réaction	ΔG_{moyen} (kcal/mol)
	$\text{S}=\text{SO}_3^{2-} + \text{MeS}^-$	$14,4 \pm 1,0$
	$\text{S}=\text{SO}_2(\text{OH})^- + \text{MeS}^-$	$-7,1 \pm 2,9$
	$\text{S}=\text{SO}(\text{OH})_2 + \text{MeS}^-$	$-22,8 \pm 5,1$

Nos résultats ont permis d'identifier des résidus de TSTD1 essentiels à la catalyse en présence de 3-MP (Gln80, Arg107) ou de TS (Glu31, Arg84) qui ne sont pas conservés. En effet, un alignement de séquences d'enzymes à domaine rhodanèse présentant une Cys catalytique a été généré à partir de la superposition de 14 structures tridimensionnelles en utilisant le module Multiseq dans le programme VMD (collaboration avec le Dr. Guillermo Mulliert, CRM² – Université de Lorraine). Après ajout de la séquence de la Rhodanèse, deux familles peuvent être identifiées : une TSTD1-like majoritaire présentant la signature Glu/Asp31 et Arg84, et une autre regroupant les Rhodanèses humaine et bovine, et la GlpE et la PspE d'*E. coli* (Figure 70). Alors qu'il a été montré que ces quatre enzymes sont des TST, l'activité TST n'a été caractérisée que pour la TSTD1, l'enzyme d'*Azotobacter vinelandii* (1E0C, Forlani *et al.*, 2003) et l'enzyme bifonctionnelle persulfure dioxygénase-rhodanèse de *Burkholderia phytofirmans* (5VE3, Motl *et al.*, 2017) parmi les 11 TSTD1-like. Il est intéressant de retrouver dans cette famille le domaine catalytique de la Cdc25B humaine et l'arsenate/antimonate reductase de *L. major* qui présentent la signature Glu31/Arg84 mais une boucle catalytique plus longue d'un résidu (CX₅R vs. CX₄R). Ces deux enzymes présentent une promiscuité d'activité phosphatase et arsenate réductase (Bhattacharjee *et al.*, 2009) et la présence de la signature TSTD1-like suggère l'existence d'une activité thioltransférase. D'ailleurs, le site actif de toutes ces enzymes est adapté à la stabilisation d'oxyanions ou de thiolates par contre le facteur discriminant semble être la longueur de la boucle catalytique comme cela a été montré pour la TST d'*A. vinelandii* dont l'activité phosphatase a été révélée après allongement de la boucle d'un résidu (Forlani *et al.*, 2003). Le fait que la boucle soit plus longue dans les Cdc25 et arsenate réductase ne devrait pas être un obstacle à l'existence d'une activité de type TST, les chaînes latérales des résidus Cys79, Glu31 et Arg84 étant parfaitement superposables (Figure 71).

1
tstd1_a
1e0c_ad
3hzu_ad
3ipo_ad
5ve3_ad
3dlp_a
5hpa_a
3fs5_ad
1c25_ad
1cwt_ad
2j0p_a
1boh_ad
2jtr_m1
1gmx_a
Rhodanèse

60
-----APTIVSLPELRSLLA---S-----GRARLDFVRSREAA---A-----GTIPGA
-----L-P-APAG--GPVALS-L-----D-----EPTASRDYLLGRLG-A-----ADLAIWDARSPOEYRGE-KV-----L-A-A-KGGHIPGA
-----V-PTKICT--GYFVQ-R-----N-----PIRAFRRDDVAILG-A-----QPLIDVRSPEYTGK-RTHMPDYEEGA-L-RAGHIPA
ERGTPPK-VKAEPDFG-VKIP--A-----Q-----OLMLDMEQARGLLH-R-----ODASLVSIRSWPFFIGT-TS-----GY--SYI-K-PKGIAGA
-----P-----C-SFA-GIW-EINAQWLEENL-----PWALIT-----RAVEIVDREPEFN---GP-----LGRIPAA
-----N-----IQ-SYSFEDXKRIVG-KHD-----PNVVLVREPEYS-I-----PNVVLVREPEYS-I-----VHI PAA
-----T-TTISPHDAQELIA-R-----G-AKLIDIRDADAYL---R-----G-AKLIDIRDADAYL---R-----EHIPEA
-----M-----DS-----YSITN-----VK-YIDPTELEHRWMO--EGHTTTLRE--PFOVVDVRG-SDYM--G-----GHIKDG
-----MLIGDFSKG-Y-LFHTV---A-GKHQDLK-YISPEIMASVINGKFN-----LIFEFVIIDCRYPYIE--G-----GHIKTA
-----DHRELIGDYSKA-F-LLQTV---D-GKHQDLK-YISPETMVALLTGFSN-----IVDKFVIIDCRYPYIE--G-----GHIKTA
-----N-----YT-YIKPEELVELLD--NPD-----SLVKAIVIDCRD-SBRD--C-----GFI VNS
-----P-SR-PEPA-IF-KAT-L-----R-----KRFQLVDSRAQGRZLGTQPE--P--D-AVGLDSDHIRGS
-----M-----D-----Q-----FE-CINVADAHQKLQ-E-----KEAVLDIRDPQSF-A-M-----EHVQQA
-----D-----R-----SLLKTYEQVLENLE--S-----KRFQLVDSRSQGRFLGTEPE--P--D-AVGLDSDHIRGA

121
tstd1_a
1e0c_ad
3hzu_ad
3ipo_ad
5ve3_ad
3dlp_a
5hpa_a
3fs5_ad
1c25_ad
1cwt_ad
2j0p_a
1boh_ad
2jtr_m1
1gmx_a
Rhodanèse

180
-----S-E-LE-----A-LQ-----MEPAAFOALYSAEKP-K-L-----ED-E-HLVFFFQMG-KRGLQATQLARS-L-----G-----Y-T--GARNYA
-----T-A-AMDPSPALRIRT--DIAGR-L-----E-E-----LG-I--T-P-----DK-----EIVTHUQTH-HRSGLTYLIATA-L-----G-----Y-P--RVKGYA
-----G-K-AADE--SGFRSREELRLY-----D-----F-I--N-P-----DD-----QTVVYCRIG-ERSHTWFVTHLL-----G-----K-A--DVRNYD
RWGHAGSDSTHME-D-FHNP--DGTWRSADDITAM-W-----K-A-----WN-I--K-P-----EQ-----QVSFYUGTG-WRASSETFWARA-M-----G-----W-K--NVSYYD
-----G-E-LA-----R-T-----A-----E-L--T-K-----DR-----PIVTURAG-GRSAQATVMLRQ-A-----G-----F-E--RVANLP
-----RSH-P-----D-----A-FA--LDPLFEKQIGPKP--D-S-----AK-----ELIFYCASG-KRGEAQKVASS-H-----G-----Y-S--NLSLYP
-----S-V-LE-----Q-----SGL-----PA-----K-L--R-H-----E-----QIFHUQAG-KRTSNADKIAA-I-----AAP--AEFLLE
-----S-R-LKQ-----DP-----EY-LREL-KH-----R-L--LEKQ-----ADRGALNVIHFUMLSQGRGSPSAAMLLR-SL-DT---A--E-LSRCRLMVLIR
-----M-E-----E-----E-VEDEFLLK-----K-P--IVPTD-GK-RV-----IVVFHCFSESERGFPMCRVIRE-RDRLGNEYFKLHY-P-----ELYVLK
-----L-E-----R-----D-AESFLLK-----S-PI-APC-SLDK-RV-----ILIFHCFSERGFPMCRFIRE-RDRAVNDYPSLYY-P-----EMYILK
-----I-S-C-----TE-----EM-YEKL-AK-----T-L--FEE-----TK-----PLIATURKGG-VTACHIALAAYL-C-----G-----K-P--DVAIYD
-----M-N-FLTE--DGFEKSPEELRAM-F-----E-A-----KK-V--D-L-----TK-----PLIATURKGG-VTACHIALAAYL-C-----G-----K-P--DVAIYD
-----K-E-VK-----E-----R-I--AT-----A-V-PD-K-----ND-----TVKVCNAG-RQSQAKEIISE-M-----G-----Y-T--HYENAG
-----N-DTL-----GAF-----MR-----D-N--D-F-----DT-----PVMVMYHG-NSSKGAQAQYLLO-Q-----G-----Y-D--VVSID
-----M-D-FLTE--DGFEKGPPELRAL-F-----Q--T-----KK-V--D-L-----SQ-----PLIATCRKGG-VTACHIALAAYL-C-----G-----K-P--DVAIYD

241
tstd1_a
1e0c_ad
3hzu_ad
3ipo_ad
5ve3_ad
3dlp_a
5hpa_a
3fs5_ad
1c25_ad
1cwt_ad
2j0p_a
1boh_ad
2jtr_m1
1gmx_a
Rhodanèse

300
-----GAYREWLEK-E-----
-----GSWEWGNHPDT-----PVEL-----
-----GSWTEWGNVAVR-----PIVAG-----EE-PG-VV-----
-----GGWWEWSSDPKN-----PVATG-----ERGPSSK-----
-----GGMLRWRAEG-R-----VVE-----
-----GSXNDWVSHG-GDK-L-DL-----PVAVN-----
-----DGLDGWKKAG-L-----YL-----PDLWRAAAA-----
-----GGFSRWQSV--YGD-DESVTAG-----PSY-----R-----PM-H--H-----EDFKE
-----GGYKEFFMK--CQS-----YCEP-----QDY-----PMNHEAFKDELKTFLKTRSW-----
-----GGYKEFFPQ--HPN-----FCEP-----LI SE-EDLNSAVDH-----
-----GSWEAFYHM--YGDVRPDLMYVKLGPEQK-----GK--G-----
-----GGLKDI--A-M-----PKVKG-----A-----
-----GGFEAWQRQ--FPA-----EVAYG-----GK-----SEKA-----
-----GSWEWERRAPP-E-----SRVSO-----

Figure 70. Alignement de séquences d'enzymes à domaine rhodanèse.

Les séquences correspondent à la TSTD1 humaine (tstd1_a), la TST d'*Azobacter vinelandii* (1e0c_ad), la TST de *Mycobacterium tuberculosis* (3hzu_ad), la protéine YnjE d'*E. coli* (3ipo_ad), l'enzyme bifonctionnelle persulfure dioxygénase-rhodanèse de *Burkholderia phytofirmans* (5ve3_ad), la protéine RDL1 de *Saccharomyces cerevisiae* (3d1p_a), la protéine Ygap d'*E. coli* (5hpa_a), la protéine Ygr203w de *Saccharomyces cerevisiae* (3fs5_ad), les Cdc25A (1c25_ad) et B (1cwt_ad), l'arsenate/antimonate reductase de *L. major* (2j6p_a), la TST bovine (1boh_ad), la PspE d'*E. coli* (2jtr_ml), la GlpE d'*E. coli* (1gmx_a) et la Rhodanèse humaine.

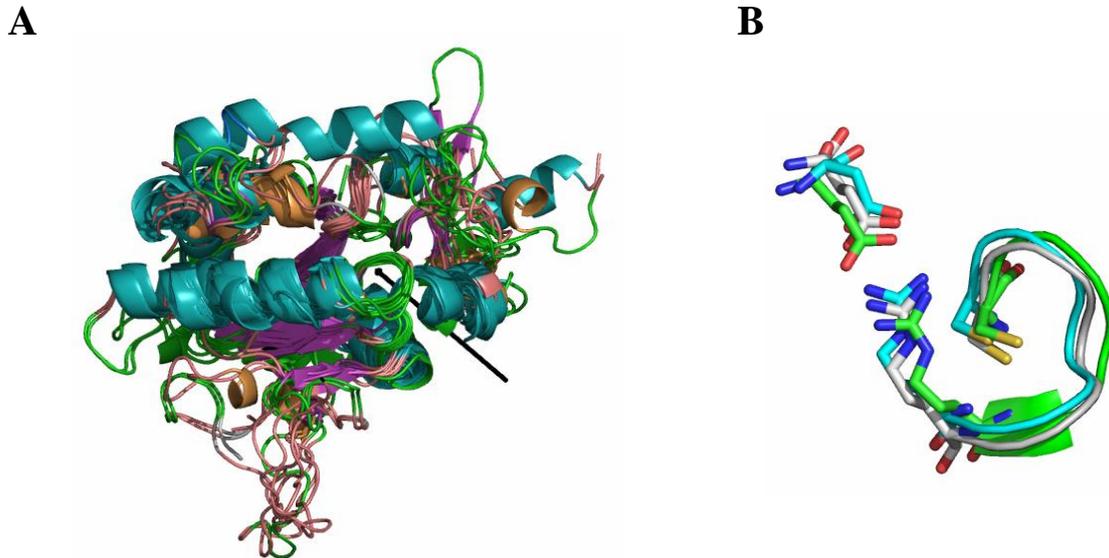


Figure 71. Superposition des 14 structures 3D utilisées pour l'alignement (A) et des résidus Glu/Asp31, Cys79 et Arg84 de la TSTD1 (vert), de la Cdc25B humaine (gris) et de l'arsenate/antimonate réductase de *L. major* (cyan) (B).

La flèche indique la position de la boucle catalytique. La figure a été réalisée à l'aide du logiciel PyMol (Shrödinger Inc.).

D'un point de vue cinétique, toutes les thioltransférases étudiées présentent un comportement coopératif à l'état stationnaire, à l'exception de la ^{Ec}3-MST. Un tel comportement pour des enzymes monomériques n'est pas un cas unique mais reste exceptionnel dans la littérature (Cornish-Bowden et Cárdenas, 1987). Deux modèles, basés sur l'existence *a minima* de deux états conformationnels de l'enzyme, ont été proposés : le modèle mnémonique (Ricard *et al.*, 1974) et le modèle de transition lente (Ferdinand, 1966). Le mécanisme des thioltransférases étant de type ping-pong, seul ce dernier permet d'expliquer leur comportement coopératif. Ainsi, les thioltransférases existeraient sous deux états conformationnels, chacun étant compétent pour une étape de transfert de soufre (Figure 72) : la conformation E pour la première et la conformation E* pour la seconde. A l'issue de la première étape de transfert de soufre (a), l'enzyme est sous forme E-SS⁻ et la transition conformationnelle E-SS⁻ → E*-SS⁻ est indispensable pour que la seconde étape ait lieu. La constante de vitesse de cette transition (k_{EE^*}) est dépendante de la concentration en substrat accepteur (S₂). A faible

Discussion & Perspectives

concentration, les deux conformations ne sont pas en équilibre rapide et k_{EE^*} est du même ordre de grandeur que le k_{cat} , d'où la coopérativité positive observée, alors qu'à forte concentration en S_2 elle est abolie ($k_{EE^*} \gg k_{cat}$). Après la seconde étape de transfert de soufre (b), la transition inverse $E^*-S^- \rightarrow E-S^-$ obéirait au même modèle cinétique avec une constante de vitesse k_{E^*E} dépendante de la concentration en substrat donneur (S_1). Le modèle proposé est cohérent avec l'existence d'une coopérativité cinétique aussi bien pour les substrats donneurs qu'accepteurs, et avec son absence pour les deux étapes de transfert de soufre (a et b) étudiées en condition de cycle catalytique unique. Le modèle est plus simple pour la ^h3-MST, l'effet coopératif n'étant observé que pour les substrats donneurs et la Trx.

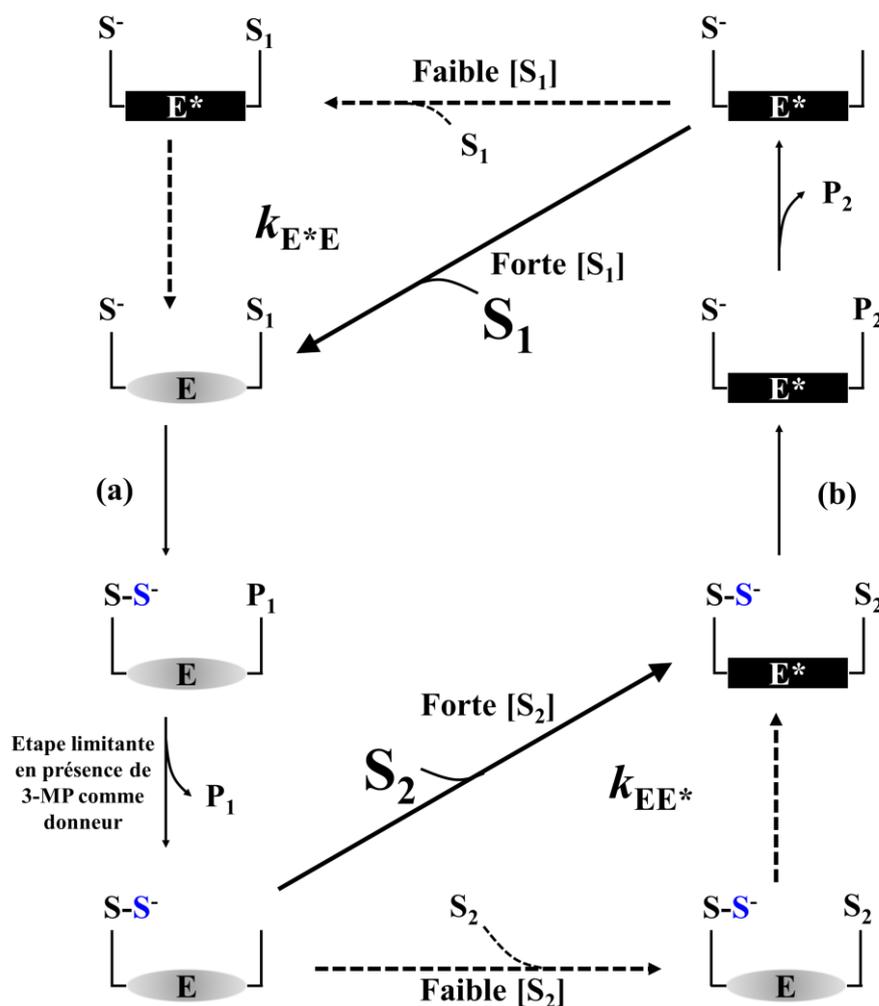


Figure 72. Modèle proposé pour expliquer la coopérativité cinétique des thioltransférases.

En ce qui concerne les TST, des travaux antérieurs réalisés sur la PspE d'*E. coli* ont montré que la formation de l'intermédiaire persulfure devait s'accompagner d'une modification de la dynamique de la boucle catalytique CysX₅ pour obtenir une conformation compétente pour la seconde étape de transfert de soufre (Li *et al.*, 2008). Pour les 3-MST, il est probable que cela soit également le cas. Dans la ^h3-MST, la boucle catalytique est stabilisée par un réseau

de liaisons H impliquant notamment l'His66, ce qui pourrait limiter la dynamique de cette boucle, hypothèse confortée par l'absence de coopérativité pour le mutant H66A. La boucle 61-66 étant plus mobile dans la $^{Ec}3$ -MST (présence de 2 conformations de la boucle, Figure 73) et le réseau de liaison H avec la boucle catalytique n'étant pas présent dans la structure 3D, la dynamique de la boucle CysX₅ serait intrinsèquement plus importante et non cinétiquement limitante par rapport à la réaction globale, d'où l'absence de coopérativité cinétique.

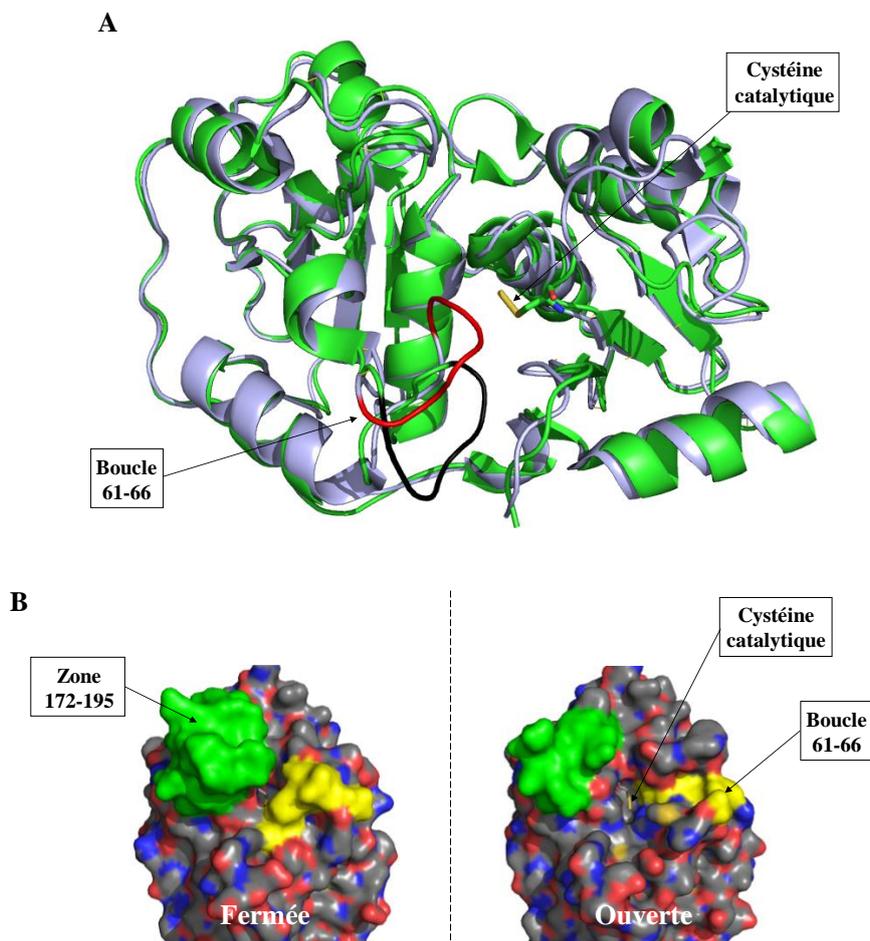


Figure 73. Superposition des conformations ouvertes et fermées de la structure tridimensionnelle de la $^{Ec}3$ -MST en mode « rubans et flèches » (A) et représentation des surfaces moléculaires de l'enzyme en conformation fermée et ouverte (B) (PDB : 1URH).

A : Sont représentées les chaînes principales de la conformation ouverte (en bleu) et fermée (en vert) en mode « rubans et flèches », et la chaîne latérale de la cystéine catalytique sous forme persulfure en mode « boules et bâtons » avec l'atome de soufre en jaune. La boucle 61-66 est représentée en rouge pour la conformation ouverte et en noir pour la conformation fermée.

B : Représentation des surfaces moléculaires des formes ouverte et fermée de la $^{Ec}3$ -MST, les atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre sont représentés respectivement en noir, bleu, rouge et jaune. La cystéine catalytique est sous forme persulfure et elle est présentée en mode « boules et bâtons » avec l'atome de soufre en jaune. La zone 172-195 étant représentée en vert et la boucle 61-66 en jaune.

La flexibilité plus importante de la structure de la $^{Ec}3$ -MST ne se limite pas à la boucle 61-66 mais concerne également la zone 172-195 qui apparaît désordonnée avec une absence de densité électronique pour les résidus 182 à 191 (Figure 73). La dynamique plus importante de

Discussion & Perspectives

ces deux régions pourrait contrôler en partie l'accessibilité du site actif et expliquer la dissociation plus rapide du pyruvate par rapport à l'enzyme humaine (facteur ≥ 300). Par contre, ces deux régions semblent être moins mobiles dans la ^h3-MST (densité électronique continue et une seule conformation) sans pour autant limiter l'accès au site actif qui diffère de celui de la ^{Ec}3-MST (Figure 74). La libération du pyruvate nécessite-t-elle dans ce cas un réarrangement conformationnel de plus grande ampleur, comme par exemple un mouvement des deux domaines rhodanèse, le site actif étant localisé à l'interface ? En collaboration avec les Drs. Isabelle André et Sophie Barbe (LISBP – Toulouse) une approche mixte robotique / modélisation moléculaire sera utilisée pour caractériser les trajectoires d'entrée et de sortie des substrats et produits dans les deux 3-MST et valider ou non nos hypothèses. Cette étude pourrait également permettre de comprendre au niveau moléculaire l'effet « accélérateur » du sulfite sur la libération du pyruvate pour la ^h3-MST ($k_{\text{off}} \times 1000$).

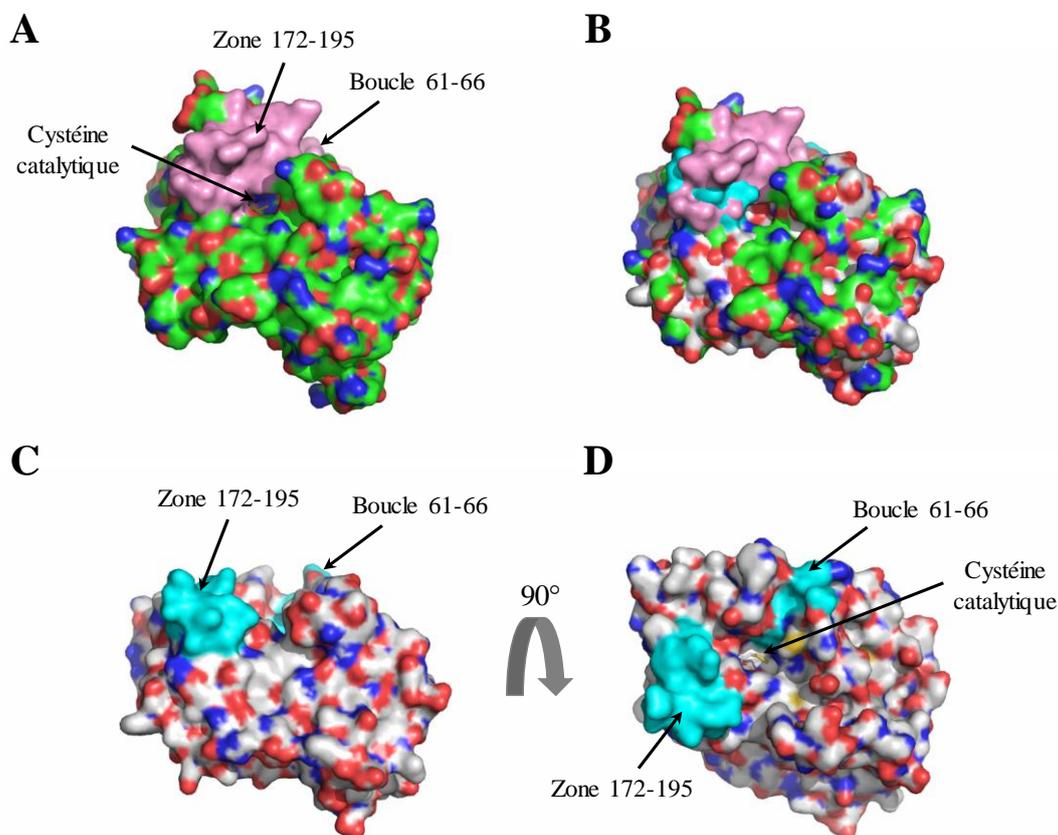


Figure 74. Représentation des surfaces moléculaires des deux 3-MST (PDB : 1URH et 4JGT).

A : ^h3-MST, la boucle 61-66 et la zone 172-195 sont colorées en rose, la Cys catalytique est représentée en mode boules et bâtons et les C α sont colorés en vert.

B : Superposition des structures ^h3-MST et ^{Ec}3-MST. Pour cette dernière, les C α sont colorés en gris et les régions 172-195 et 61-66 sont colorées en cyan. La Cys catalytique de la ^h3-MST n'est plus visible, l'entrée du site actif étant masquée par la ^{Ec}3-MST

C : ^{Ec}3-MST selon une orientation identique à celle de la superposition avec ^h3-MST.

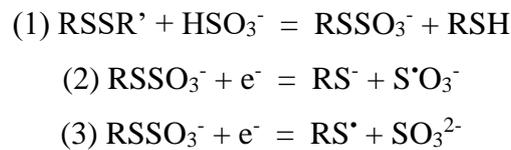
D : Une rotation de 90° vers l'avant est nécessaire pour le site actif et la Cys catalytique de la ^{Ec}3-MST soient visibles.

II. Quels rôles physiologiques pour les thioltransférases humaines ?

1) La ^h3-MST : Un système cytosolique d'élimination du sulfite

De manière inattendue, l'ensemble des résultats cinétiques obtenus à l'état pré-stationnaire et stationnaire montrent que le sulfite est un très bon substrat accepteur pour la ^h3MST et conduisent à proposer un rôle non décrit dans la littérature d'élimination du sulfite.

Le sulfite est une molécule très réactive et hautement toxique pouvant conduire à des maux de têtes, allergies et asthme pour les conséquences les moins graves jusqu'à des problèmes cardiovasculaires et une augmentation du risque de cancer pour les conséquences les plus graves (Shih *et al.*, 1977 ; Andersson *et al.*, 2013 ; Ozsoy *et al.*, 2016). A l'échelle de la cellule, le sulfite est connu pour induire un stress oxydatif intense lié à un phénomène d'autooxydation formé suite à l'attaque nucléophile de cette molécule sur les ponts disulfures des protéines (Neta et Huie, 1985) :



Dans la cellule, il y a une molybdo-enzyme mitochondriale, appelée sulfite oxydase, qui permet d'éliminer le sulfite sous forme de sulfate. Néanmoins cette enzyme n'est pas exprimée dans toutes les lignées cellulaires et elle est absente du cytosol.

Par conséquent, la ^h3-MST étant présente dans le cytosol, elle pourrait assurer la transformation du sulfite en thiosulfate en présence de 3-MP comme donneur. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les patients ayant une déficience en sulfite oxydase présentent des concentrations en thiosulfate augmentées dans les urines (Shih *et al.*, 1977). Inversement dans le cas d'une déficience en 3-MST, il a été montré que le patient présentait des quantités de thiosulfate réduites dans les urines (Crawhall, 1985), les études de cas cliniques sont par conséquent en accord avec le fait que le thiosulfate pourrait être une forme d'élimination du sulfite (Figure 75).

Discussion & Perspectives

Afin d'évaluer à l'échelle cellulaire la contribution de cette voie d'élimination 3-MST dépendante, une collaboration a été initiée avec le Pr. Pascal Reboul (IMoPA – Equipe IDePRAP) et le Dr. Hélène Schneider (SRSMC – Université de Lorraine) à partir d'un modèle de cellules hépatiques. La stratégie consiste à établir ou non une corrélation entre la résistance des cellules HepaRG au sulfite et l'activité de la ^h3-MST.

D'autre part, la mise en évidence de cette nouvelle activité a conduit au dépôt d'un brevet concernant la mise au point d'un procédé enzymatique d'élimination du sulfite (BNT221454FR00, dépôt janvier 2017). L'invention étant brevetée, une étape de maturation est en cours dans le but de finaliser le procédé.

2) Les thioltransférases dans le métabolisme d'H₂S

a) Anabolisme et signalisation : de nouveaux rôles pour les TST ?

Comme indiqué dans le paragraphe III-2) du chapitre III des résultats, la TSTD1 et la Rhodanèse sont capables de produire du sulfure d'hydrogène en présence de GSH, de cystéine ou de DHLA comme substrat accepteur. Ces enzymes pourraient participer à la production d'H₂S dans la mitochondrie tout comme la ^h3-MST, la contribution de chacune dépendant de leurs concentrations et de la disponibilité de leurs substrats. D'autre part, les données cinétiques montrent qu'H₂S est un bon substrat accepteur pour les TST humaines et dans ces conditions la réaction conduit à la formation d'espèces polysulfures comme par exemple H₂S₂ (caractérisée par une augmentation de l'absorbance à 372 nm corrélée à une diminution de la [H₂S]). Ainsi l'activité thioltransférase des TST pourrait permettre d'expliquer pour la première fois la formation de ces espèces qui sont décrites comme étant responsables de la signalisation H₂S dépendante (voir chapitre I, partie I-5) de l'introduction). La formalisation d'un mécanisme nécessitera d'identifier par spectrométrie de masse les espèces polysulfures formées.

b) Catabolisme : deux voies possibles ?

Les substrats persulfures représentent une partie des formes liées d'H₂S dans l'organisme et nous avons montré que la réaction de transfert de soufre du GSSH vers le sulfite catalysée par la Rhodanèse est efficace ($6.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Cette TST pourrait donc être impliquée dans une voie SOU-indépendante d'élimination d'H₂S sous forme de thiosulfate dans la mitochondrie (Figure 75). Cette proposition est cohérente avec le fait que le thiosulfate est la

forme d'élimination majoritaire du sulfure d'hydrogène dans l'organisme, cette molécule pouvant être éliminée au niveau des reins par voie urinaire (Bulmer *et al.*, 2008). De plus, il est tentant de proposer que cette voie SOU-indépendante puisse jouer un rôle important de détoxication dans les cellules nerveuses pour lesquelles l'implication du complexe SOU a été exclue (voir introduction paragraphe II.3 du chapitre I).

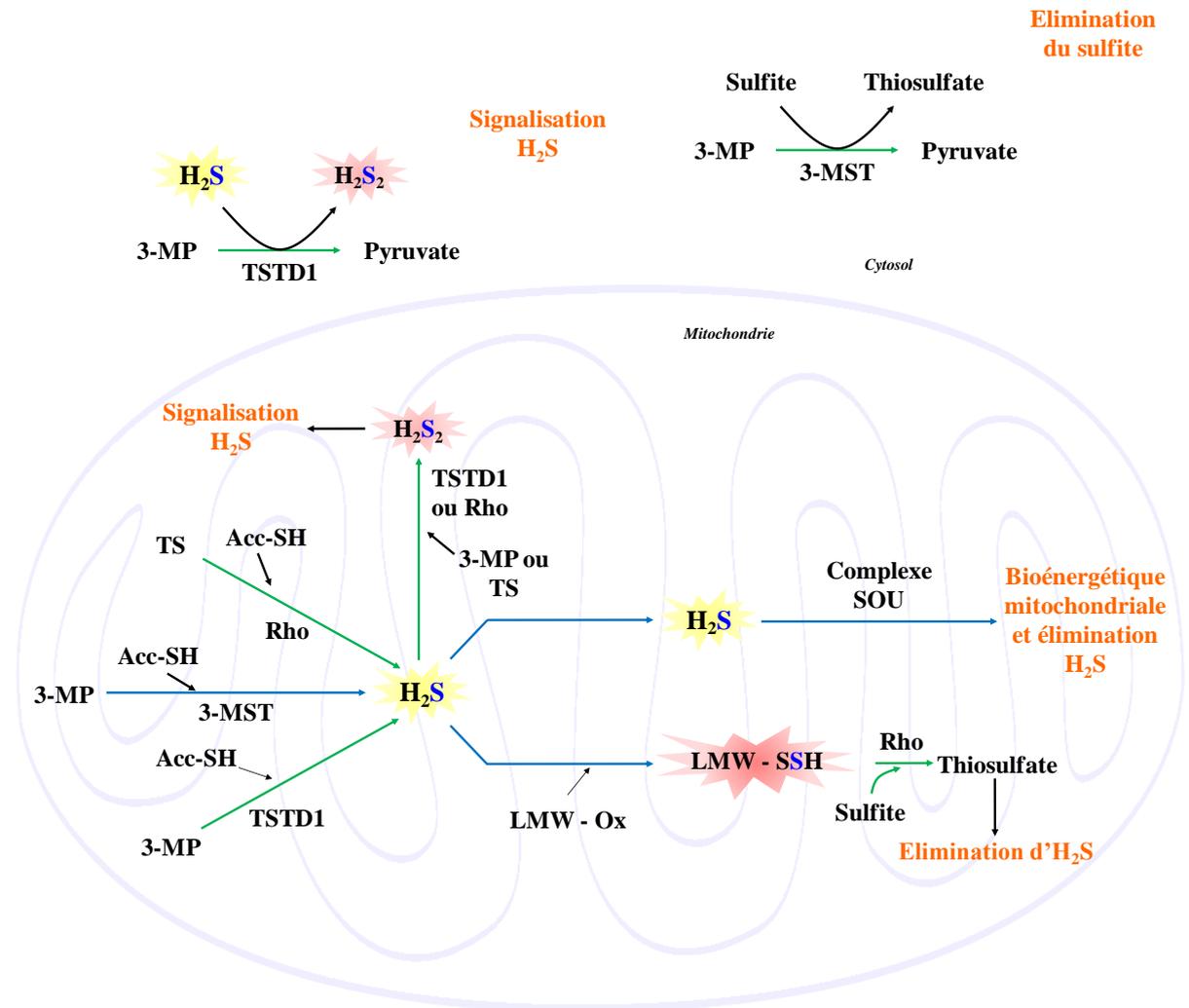
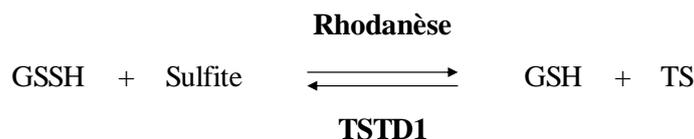


Figure 75. Bilan des différents rôles physiologiques des thioltransférases.

En plus des rôles décrits dans la littérature (production d'H₂S dans la matrice mitochondriale pour la h³-MST, élimination H₂S SOU-dépendante pour la TSTD1 et/ou la Rhodanèse), de nouveaux rôles sont proposés : élimination du sulfite sous forme de thiosulfate au niveau cytosolique pour la h³-MST et au niveau mitochondrial pour la Rhodanèse ; production d'H₂S au niveau mitochondrial pour les TST humaines ; production de polysulfures (« H₂S₂ ») au niveau mitochondrial pour les TST humaines mais également au niveau cytosolique pour la TSTD1. L'acronyme LMW se rapporte à l'anglais « Low Molecular Weight », ces espèces correspondent aux molécules à thiol de petite taille telles que la L-cystéine et le GSH. La désignation Acc-SH se réfère aux accepteurs à thiol qui sont le GSH, la cystéine, la Trx et le DHLA. Les flèches en bleu correspondent aux rôles décrits dans la littérature et celles en vert aux nouveaux rôles proposés.

L'étude des spécificités de substrats des deux TST humaines montre qu'elles catalysent la même réaction de transfert de soufre mais en sens opposé :



Ces résultats confirment ce qui avait été proposé dans la littérature et suggèrent que ces deux TST peuvent être impliquées dans le mécanisme SOU-dépendant d'élimination d'H₂S. Celui-ci serait constitué de deux voies utilisées selon la nature du substrat (sulfite ou GSH) pris en charge par la SQOR (Figure 76). Il est admis dans la littérature que la réaction catalysée par la SQOR est nettement plus efficace en présence de sulfite par rapport au GSH, ce qui semble favoriser la voie SQOR/TSTD1/ETHE1. Cependant, la concentration intracellulaire de sulfite étant sujet à débat entre les équipes des Drs. Jorns et Banerjee, la voie SQOR/ETHE1/Rhodanèse ne peut pas être écartée (Augustyn *et al.*, 2017 ; Landry *et al.*, 2017).

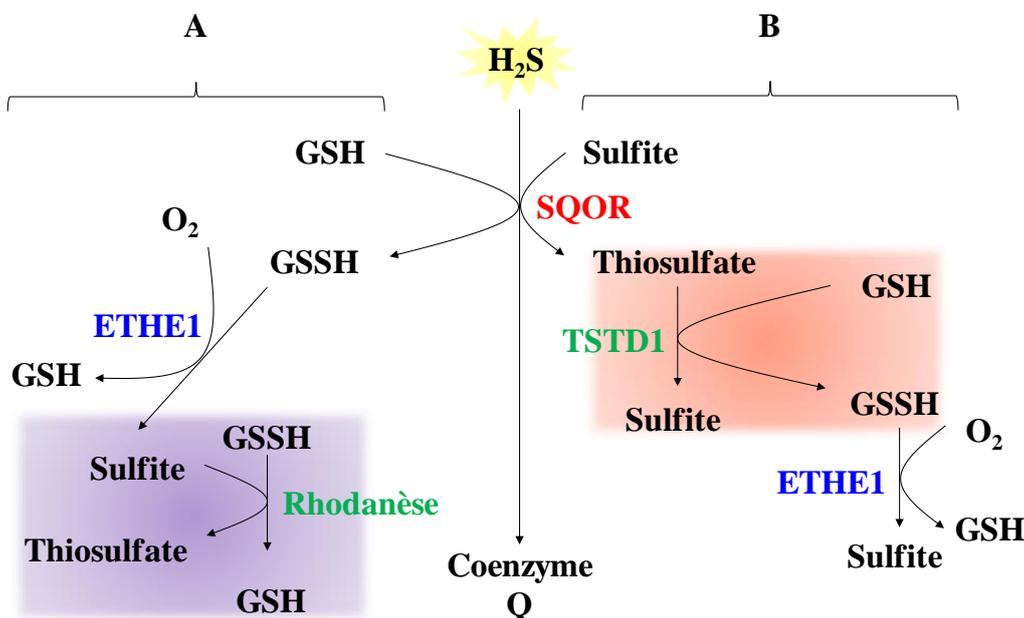


Figure 76. Mécanismes d'élimination d'H₂S impliquant le complexe SOU.

A : Mécanisme proposé par le groupe du Dr. Banerjee (Libiad *et al.*, 2014) : le GSH est préférentiellement utilisé par la SQOR conduisant à la formation de GSSH. Le GSSH est utilisé par ETHE1 pour produire du sulfite et par la Rhodanèse pour produire du thiosulfate à partir du sulfite.

B : Mécanisme proposé par le groupe du Dr. Jorns (Melideo *et al.*, 2014) : le sulfite est le substrat utilisé par la SQOR conduisant à la formation de thiosulfate. Ensuite la TSTD1 catalyse le transfert de soufre du thiosulfate vers le GSH conduisant à la formation de sulfite et GSSH. qui est utilisé par la TSTD1 pour former à partir de GSH du GSSG. Enfin, le GSSH est utilisé par ETHE1 pour produire du sulfite qui est transformé en sulfate par la sulfite oxydase (SO).

Indépendamment des spécificités de substrats des enzymes impliquées, la formation du complexe SOU dépend des affinités entre les protéines partenaires et les résultats préliminaires obtenus pour l'étude des complexes binaires ETHE1/thioltransférase sont compatibles avec l'existence de ces deux voies. Les expériences d'anisotropie devront être reproduites et complétées en réalisant le marquage des thioltransférases avec la sonde fluorescente de manière

à vérifier que cette modification n'impacte pas l'interaction entre les deux protéines. Les valeurs de K_D obtenues jusqu'à présent (de l'ordre de la dizaine de micromolaires) suggèrent l'existence de complexes transitoires, dont la formation est contrôlée par les constantes de vitesse d'association et de dissociation (k_{on} et k_{off}). Des expériences d'anisotropie de fluorescence réalisées en mode stopped-flow devraient permettre de déterminer ces constantes cinétiques et peut-être d'accéder à la dynamique d'assemblage de ces complexes. Au niveau moléculaire, le fait qu'ETHE1 forme des complexes avec les deux TST et la 3-MST suggère un mode de reconnaissance non discriminant entre cette enzyme et son partenaire thioltransférase, l'élément moteur étant le repliement rhodanèse. En effet, ni le nombre de domaines rhodanèse (1 pour la TSTD1, 2 pour les autres), ni la séquence (pas d'identité de séquence entre 3-MST et TST) ne semble impacter la formation des complexes binaires. Enfin, le complexe SOU faisant intervenir un troisième partenaire, la SQOR, les études seront complétées par la caractérisation des complexes binaires SQOR/ETHE1 et SQOR/thioltransférase, ainsi que des complexes ternaires SQOR/ETHE1/thioltransférase en utilisant les mêmes approches. Pour cela, la production et la purification d'une forme soluble de la SQOR humaine sera entreprise. Cette forme tronquée des 41 premiers acides aminés (élimination de l'étiquette d'adressage à la mitochondrie) a déjà été obtenue par l'équipe du Dr. Jorns qui avait démontré son activité en solution (Jackson *et al.*, 2012).

Un dernier paramètre à prendre ne compte est la localisation subcellulaire de la TSTD1. En effet, la TSTD1 est décrite comme étant cytosolique (Wenzel *et al.*, 2003) mais l'analyse de sa séquence, *via* l'utilisation des serveurs TargetP 1.1, SubLoc v1.0 et CELLO, est en faveur d'une triple localisation nucléaire, cytoplasmique et mitochondriale. Par conséquent, il conviendra de prouver la présence ou non de la TSTD1 dans la mitochondrie par des expériences d'immunofluorescence couplées à de la microscopie confocale qui pourront être réalisées sur les modèles cellulaires utilisés pour étudier le métabolisme d' H_2S *in cellulo* (voir paragraphe suivant).

c) Thioltransférases et arthrose

Finalement, il était nécessaire de définir le rôle de ces thioltransférases dans un contexte plus intégré, c'est-à-dire à l'échelon cellulaire, d'où la collaboration entreprise avec le Pr. Pascal Reboul (IMoPA – Equipe IDePRAP). En effet, nos collègues étudient notamment les mécanismes physiopathologiques aboutissant à la destruction du cartilage articulaire au cours

Discussion & Perspectives

de l'arthrose, et utilisent pour cela des cultures primaires de cellules articulaires d'origine humaine (synoviocytes et chondrocytes issus de patients arthrosiques). Or ces cellules articulaires sont des modèles particulièrement intéressants puisque H₂S présente des propriétés anti-inflammatoires au niveau articulaire (paragraphe III-8) du chapitre I de l'introduction) et que les études menées jusqu'à présent reposent uniquement sur des apports exogènes d'H₂S (Burguera *et al.*, 2016).

Notre objectif est donc d'étudier le métabolisme d'H₂S dans ces cellules, après induction d'une inflammation par l'ajout d'IL1 β , en mesurant d'une part la production d'H₂S à l'aide de la sonde spécifique, et d'autre part l'expression des gènes codant les enzymes impliquées (thioltransférases, CBS et CSE) par PCR quantitative.

Les résultats préliminaires montrent que pour les deux types cellulaires l'ajout d'IL1 β provoque une réponse biphasique avec une production d'H₂S sur les temps courts corrélée à l'expression des gènes *CTH* (codant la CSE) et *CBS*, suivie d'une élimination sur les temps longs corrélée à l'expression des gènes codants les thioltransférases (Figure 77).

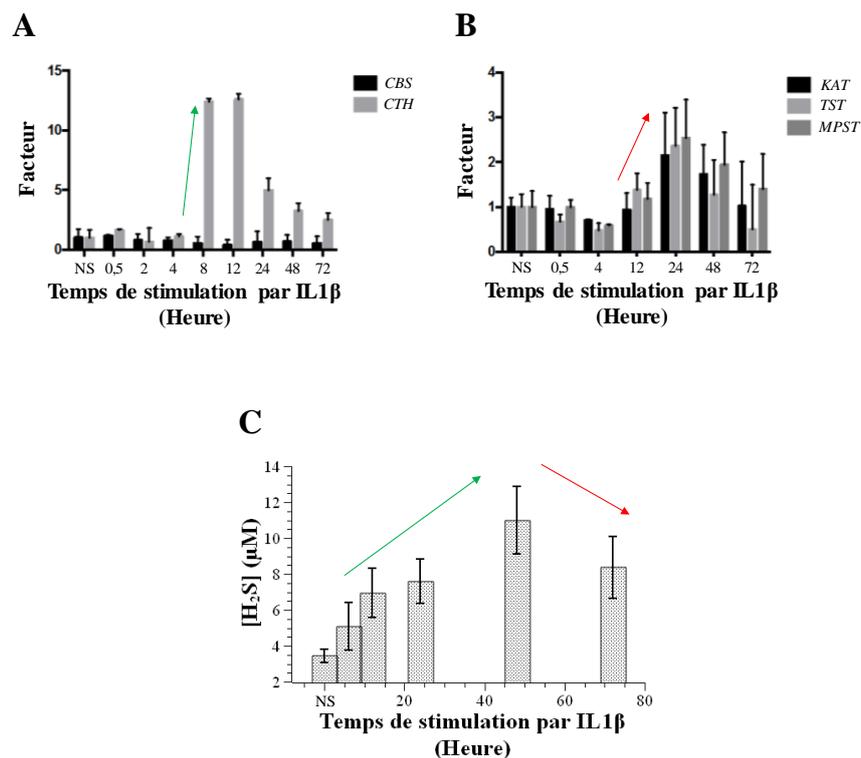


Figure 77. Résultats représentatifs obtenus après induction de l'inflammation sur des synoviocytes.

A : Variation de l'expression des gènes *CBS* et *CTH* codant respectivement la CBS et la CSE.

B : Variation de l'expression des gènes codant la TSTD1 (*KAT*), la Rhodanèse (*TST*) et la ^{h3}-MST (*MPST*).

C : Variation de la [H₂S].

Les analyses ont été effectuées avant (NS) et après ajout d'IL1 β (de 30 min à 72 heures) dans des conditions de normoxie.

Nous avons donc montré que les techniques mises au point sont adaptées à l'étude du métabolisme d'H₂S dans des lysats de cellules articulaires. Il s'agit de la première mise en évidence de la production d'H₂S endogène suite à une stimulation par l'IL1β. De plus, l'expression des gènes codant les thioltransférases semble être corrélée à la production d'H₂S, ce qui est en faveur d'une régulation de leur expression par H₂S, de façon directe ou indirecte. Enfin, ces résultats sont en faveur d'un rôle de ces enzymes dans l'élimination d'H₂S. Des expériences de « silencing » des gènes codant ces enzymes en utilisant des « siRNA » et l'utilisation de sondes fluorescentes permettant de visualiser la formation d'H₂S (Reja *et al.*, 2017) *in cellulo* pourraient permettre d'assigner des rôles spécifiques à chacune des thioltransférases, aussi bien au niveau cytosolique que mitochondrial.

Matériels & Méthodes

I. Matériels biologiques, milieux de cultures et tampons

1) Milieux et solutions tampons

Les milieux utilisés dans les techniques décrites ci-dessous sont indiqués dans le Tableau 11. Les solutions à usage courant sont listées et leur composition est détaillée dans le Tableau 12.

Tableau 11. Milieux utilisés pour la production des protéines d'intérêts.

Le milieu LB est utilisé pour la réalisation de mini préparations d'ADN plasmidique et pour les précultures réalisées préalablement à la production des différentes protéines. Ainsi que pour la production de la TSTD1 humaine et de ses mutants, de la GlpE d'*E. coli*, de la 3-MST humaine (^h3-MST) et de ses mutants, de la 3-MST d'*E. coli* (^{Ec}3-MST) et de ses mutants et de la sulfure d'oxygénase humaine ETHE1. Le milieu LBNB est utilisé pour la production de la Rhodanèse humaine. Le milieu SOC est utilisé pour la régénération des bactéries compétentes après l'étape de transformation. Ces différents milieux sont préalablement autoclavés 20 minutes à 120°C.

Milieu riche LB (Luria Bertani)	Tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH ajusté à 7,5 par ajout de NaOH
Milieu LBNB	Milieu LB, NaCl 0,5 M, bétaïne 2 mM
Milieu SOC	Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L), KCl (2,5 mM), MgCl ₂ (10 mM), MgSO ₄ (10 mM), glucose (20 mM).

Tableau 12. Les solutions tampon d'usage courant avec les tampons utilisés pour les expériences réalisées sur les enzymes d'intérêts.

Solutions tampons

Tampon A	Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8
Tampon B	Saccharose 25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8
Tampon C	Tris 50 mM, EDTA 2 mM, sulfate d'ammonium 1M, pH 8
Tampon D	Tris 50 mM, EDTA 2 mM, KCl 1M, pH 8
Tampon E	Tris 50 mM, EDTA 2 mM, 10% glycerol, pH 8
Tampon F	Tris 50 mM, KCl 100 mM, imidazole 40 mM, pH 8
Tampon G	Tris 50 mM, KCl 100 mM, imidazole 1 M, pH 8
Tampon H	Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH 6
Tampon I	Na ₂ HPO ₄ 50 mM, NaCl 1 M, pH 6
Tampon J	Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH 2
Tampon K	Acétonitrile 100%, 0,1% TFA
Tampon L	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaF 300 mM, pH 7
Tampon M	Acétate d'ammonium 50 mM, pH 6,8
Tampon N	Na ₂ HPO ₄ 100 mM, pH 8
Tampon O	CHES 125 mM, pH 8,6
Tampon P	Polytampon (Acide acétique 30 mM, Tris 120 mM et Imidazole 30 mM)

Matériels & Méthodes

2) Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans les techniques décrites ci-après sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Souches bactériennes utilisées pour les étapes de clonage et de surproduction des protéines d'intérêts.

La souche DH5 α est utilisée pour la préparation d'ADN plasmidique. La souche BL21 (DE3) pour l'expression et la production des protéines ^{h3}-MST et de ses mutants, Rhodanèse et ETHE1. Tandis que la souche C41 (DE3) est utilisée pour l'expression et la production de la ^{Ec3}-MST et ses mutants, de la TSTD1 et de ses mutants ainsi que de la GlpE.

<i>E. coli</i> DH5α	supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1. <u>Utilisation</u> : cette souche est utilisée pour la préparation de l'ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B -m _B -) λ (DE3). <u>Utilisation</u> : Cette souche est utilisée pour l'expression et la production de protéines recombinantes. 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, permettant l'expression de protéines dont la séquence codante est placée sous le contrôle du promoteur T7.
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	Souche dérivée de la souche BL21(DE3) : F ⁻ dcm ompT hsdSB (r _B -m _B -) gal (DE3) et deux mutations non caractérisées (285). Elle 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, permettant l'expression de protéines dont la séquence codante est placée sous le contrôle du promoteur T7.

3) Plasmides

Les différents plasmides d'expressions utilisés pour la production des protéines recombinantes d'intérêts sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 78). Ils ont été obtenus selon les protocoles décrits ci-après dans le paragraphe II-1).

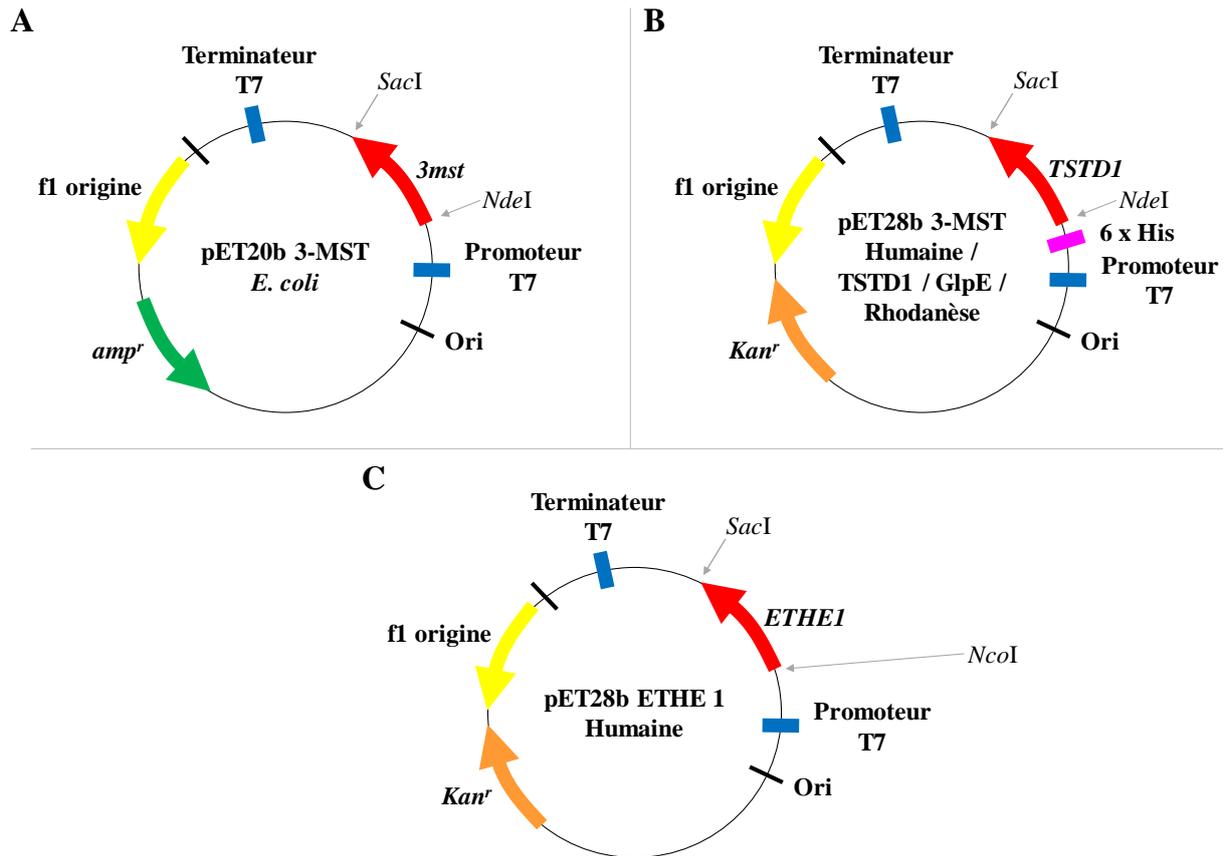


Figure 78. Plasmides pET20b ^{Ec}3-MST (A), pET28b TSTD1 / ^h3-MST / GlpE / Rhodanèse (B) et pET28b ETHE1 (C).

Kan^R : gène de résistance à la Kanamycine ; Amp^R : gène de résistance à l'Ampicilline ; origine f1 : origine de réplication du phage filamenteux f1 ; ori : origines de réplication du plasmide ; promoteur T7 : promoteur du phage T7 reconnu par la T7 polymérase ; terminateur T7 : terminateur du phage T7 ; 6 x His : étiquette formée d'une séquence de 6 résidus His ; NdeI, SacI et NcoI : sites de restriction.

II. Techniques de génie génétique

1) Clonage / sous-clonage

Au préalable à la production/purification des différentes enzymes, nous devons disposer de vecteurs d'expressions permettant la production de ces protéines dans l'hôte *Escherichia coli*. Les plasmides pET20b ^{Ec}3MST et pET28b GlpE étaient déjà disponibles lors de mon arrivée au laboratoire.

La séquence codante du gène *MPST* humaine a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN_c présent dans le plasmide commercial pOTB7-3MST (BioScience lifeScience). L'amplification a été réalisée par ajout des amorces sens et anti-sens, des dNTP (1,25 mM de chaque), du

Matériels & Méthodes

tampon de réaction et de la polymérase *pfu* dont la processivité est de 1 kb/minute. Les amorces utilisées permettent d'introduire un site de coupure par *NdeI* en 5' de la séquence codante et un site de coupure par *SacI* en 3'. L'amplicon a ensuite été purifié sur gel agarose 0,8% par l'utilisation du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). La séquence codante du gène *MPST* humain a été insérée dans le vecteur pCR-Blunt II par ligature réalisée selon un ratio molaire 2/1 en utilisant la T4 DNA ligase sur la nuit à température ambiante.

Les séquences codantes des gènes *KAT*, *TST* et *ETHE1* humains (codant respectivement les protéines TSTD1, Rhodanèse et ETHE1) ont été synthétisées par la société GeneArt® (ThermoFisher Scientific), ces séquences ont été optimisées pour la production de la protéine humaine dans l'hôte *Escherichia coli*, cette optimisation permettant d'éliminer les codons rares dans la séquence nucléotidique. Ont également été ajoutés en 5' de la séquence codante, un site de restriction *NdeI* pour les gènes *KAT* et *TST* et *NcoI* pour le gène *ETHE1* et un site de restriction *SacI* en 3' des trois séquences codantes. Ces séquences nucléotidiques ont été placées dans un vecteur commercial de type pMAT par la société.

A ce stade, les séquences codantes sont toutes présentes dans des vecteurs « navettes ». Il s'ensuit une étape de sous-clonage dans des vecteurs d'expression de type pET28b. Les vecteurs pMAT et pCR-Blunt II sont clivés par l'ajout de *NdeI* ou *NcoI* en fonction des cas et de *SacI*, les fragments ainsi extraits ont été purifiés sur gel agarose 0,8% par l'utilisation du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Une étape de ligature permet l'intégration des séquences codantes des différents gènes dans les vecteurs d'expression de type pET28b grâce à la T4 ligase (Figure 79). Une étape de séquençage par une société privée (GATC Biotech. Compagny) a permis de vérifier l'absence de mutations dans la séquence codante de chacun des gènes d'intérêts.

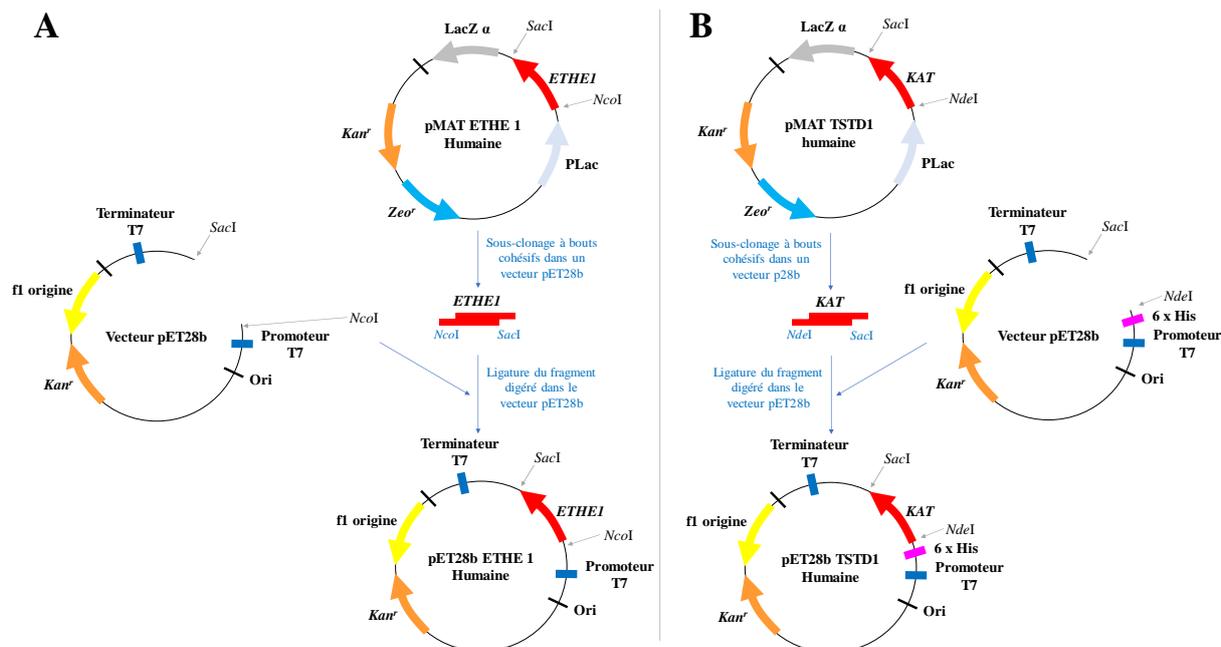


Figure 79. Stratégies de sous-clonage permettant l'obtention des différents plasmides d'expression utilisés pour la production des enzymes d'intérêts.

A : Sous-clonage du gène *ETHE1* par digestion du plasmide commercial pMAT ETHE1 par les enzymes de restriction *NcoI* et *SacI* puis ligature du fragment dans le vecteur pET28b.

B : Exemple de sous-clonage utilisé pour l'obtention des vecteurs d'expressions codant la TSTD1, la Rhodanèse et la ^{h3}-MST. Le vecteur commercial a été digéré par *NdeI* et *SacI* et le produit de digestion a été inséré dans le vecteur pET28b. Il est à noter que le gène codant la ^{h3}-MST était présente initialement dans le vecteur pOTB7- 3MST (BioScience lifeScience), par conséquent il s'agit du gène natif non optimisé pour la synthèse dans l'hôte *E. coli*.

2) Mutagenèse dirigée

Afin de déterminer le rôle des résidus impliqués dans le mécanisme catalytique des thioltransférases à domaine rhodanèse, il était indispensable de disposer de différents mutants. Les vecteurs d'expressions codant pour ces mutants ont été obtenus par mutagenèse dirigée réalisée sur le vecteur d'expression codant la forme sauvage de l'enzyme d'intérêt.

Les réactions de mutagenèses dirigées par PCR ont été réalisées en présence de l'ADN polymérase thermostable *Pfu*[®] de *Pyrococcus furiosus* (Fermentas), de deux oligodésoxyribonucléotides complémentaires d'un des deux brins du plasmide et portant la mutation à introduire, du plasmide à muter et de dNTP (Fermentas). L'ADN polymérase *Pfu*[®] a été utilisée en raison de sa haute fidélité, due à son activité 3'-exonucléase qui permet la correction des erreurs de réplication. Le produit amplifié, selon le protocole de PCR présenté dans la Figure 80, a été traité par l'endonucléase *DpnI* (Fermentas) afin de sélectionner l'ADN néosynthétisée portant la mutation. L'enzyme *DpnI*, qui présente une spécificité pour l'ADN méthylé et hémiméthylé (séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), permet la digestion de l'ADN parental issu de la souche *E. coli* DH5α qui est *dam* méthylé. Une fraction du mélange de digestion est

Matériels & Méthodes

utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* DH5 α compétentes. Après une étape de culture sur milieu solide sélectif, l'ADN plasmidique de certains clones bactériens a été extrait par la technique de mini-préparation et analysé par séquençage (GATC Biotech. Compagny).

A

Constituants	Concentrations
<i>Pfu</i> polymérase	2 U/ μ L
Tampon <i>Pfu</i> (10 X)	1 X final
Plasmide pET28b / pET20b	6 ng/ μ L
Amorces sens et antisens	1 μ M
dNTP	1.25 mM de chaque
H ₂ O	qsp 50 μ L

B

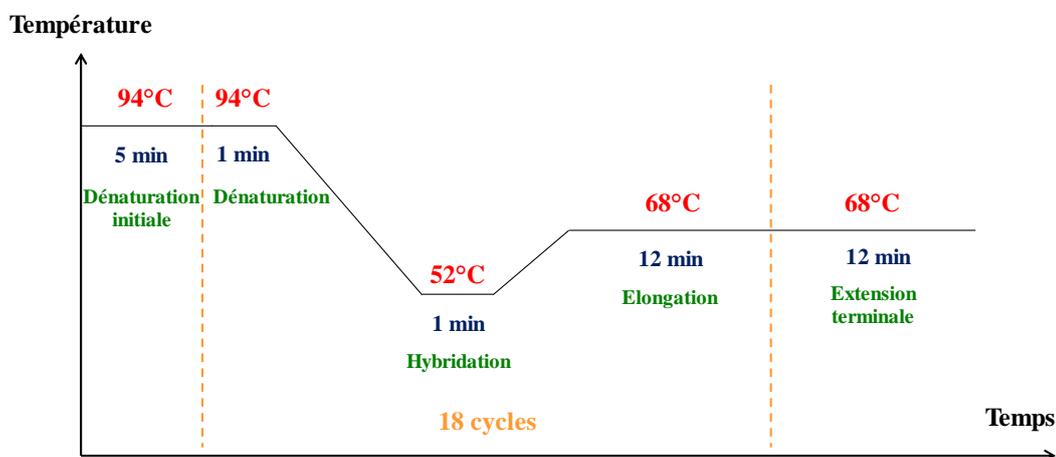


Figure 80. Tableau récapitulatif des constituants du mélange de PCR (A) et schéma du protocole permettant d'obtenir les mutants par réaction de polymérisation en chaîne (B).

Le graphique en B représente la température du thermocycleur en fonction du temps. La première étape permet la dénaturation de la double hélice d'ADN à 94°C pendant 5 minutes. Puis la programmation se compose de 18 cycles : une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation des amorces à 52°C pendant 1 minute et une étape d'élongation par l'ADN polymérase *Pfu* à 68°C pendant 12 minutes. Le programme se termine par une étape de 68°C pendant 12 minutes permettant l'extension terminale.

3) Transformation des bactéries compétentes

La méthode classique du choc thermique est utilisée pour transformer les bactéries compétentes *E. coli* DH5 α , BL21 (DE3) et C41 (DE3) avec le produit de ligation ou le produit de mutagenèse. Les cellules bactériennes ont subi un traitement provoquant une augmentation de la perméabilité de leur membrane : des micropores sont formés par l'action de sels tel que le CaCl₂. Un mélange constitué de 1 à 100 ng de plasmide et de 50 μ L de bactéries compétentes est refroidi 30 minutes dans la glace et ensuite soumis à un choc thermique à 42°C de 30 secondes, suivi d'un refroidissement de 2 minutes dans la glace. Une étape de régénération est

réalisée par ajout de milieu SOC et incubation 1 heure à 37°C sous agitation. Après transformation, la sélection des bactéries ayant intégrées le plasmide se fait sur milieu LB solide supplémenté avec un antibiotique de résistance appropriée au plasmide utilisé.

III. Obtention des protéines recombinantes

1) Production et purification des protéines recombinantes ^{Ec}3-MST et ETHE1

La ^{Ec}3-MST est exprimée *via* l'utilisation du pET20b, par conséquent cette protéine recombinante ne possède pas d'étiquette. Il en est de même pour ETHE1 puisque le sous-clonage dans le vecteur pET28b a été réalisé par l'utilisation de l'enzyme de restriction *Nco*I supprimant ainsi la présence de la séquence nucléotidique codant l'étiquette 6 x His.

a) Production et extraction des protéines recombinantes ^{Ec}3-MST et ETHE1

La protéine ^{Ec}3-MST ainsi que les différents mutants ont été produits dans la souche C41 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET20b ^{Ec}3-MST (ou par les plasmides mutés dans le cas des mutants) dans le milieu LB. Les cultures sontensemencées au 1/20^{ème} en milieu LB supplémenté en ampicilline (200 mg/L) et placées à 37°C sous agitation. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,8, l'expression est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside). Les cellules sont ensuite placées pendant une nuit à 20°C sous agitation puis récoltées par centrifugation à 3000 g et lavées dans le tampon B. Après centrifugation à 3000 g, les culots cellulaires peuvent être utilisés directement pour la purification, ou conservés à -20°C.

ETHE1 a été produite dans les cellules BL21 (DE3) par transformation du vecteur pET28b ETHE1. Les cultures sontensemencées au 1/20^{ème} en milieu LB supplémenté en kanamycine (0,5 mg/L) avec une concentration finale de 250 μM de Fe(II)SO₄ et placées à 37°C sous agitation. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,8, l'expression est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et les cellules sont ensuite placées pendant une nuit à 37°C sous agitation puis récoltées par centrifugation à 3000 g et lavées dans le tampon B. Après centrifugation à 3000 g, les culots cellulaires peuvent être utilisés directement pour la purification, ou conservés à -20°C.

Matériels & Méthodes

La suite du protocole est le même pour les deux protéines recombinantes, les culots cellulaires sont resuspendus dans 20 mL de tampon A supplémenté avec 10 mM de DTT, 20 U/mL de benzonase et 4 mM de MgSO₄. Les cellules sont alors lysées par sonication à 4°C sous une puissance de 40W par période de deux fois deux minutes pendant 50% du temps. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 17000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant de sonication (SSO) correspond à l'extrait brut débarrassé des débris cellulaires insolubles. Ensuite le SSO est amené à 65% de sulfate d'ammonium (SA) sous légère agitation à 4°C. A cette concentration, la protéine précipite et une centrifugation à 17000 g pendant 30 minutes permet de la récupérer dans le culot qui est alors repris dans 20 mL de tampon C. Du SA est ajouté progressivement à la solution protéique, afin de ne pas induire une concentration locale trop importante qui pourrait faire précipiter la protéine, jusqu'à une concentration de 1 M. Le mélange est ensuite filtré à 0,22 µm avant injection sur colonne hydrophobe.

b) Chromatographie par interactions hydrophobes

Une colonne d'interaction hydrophobe Phényl Sépharose (agarose 6% sur laquelle sont greffés des groupements phényles) couplée à un système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®) est équilibrée avec du tampon C. L'échantillon protéique est ensuite injecté sur la colonne et l'élution est réalisée par gradient décroissant en sulfate d'ammonium allant de 1 à 0 M *via* l'utilisation du tampon A. Les fractions collectées sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE 12,5% et les tubes contenant la protéine d'intérêt sont rassemblés en une fraction qui est ensuite dialysée sur la nuit contre du tampon A après addition de 10 mM de DTT.

c) Chromatographie échangeuse d'anions

La fraction protéique contenant la ^{Ec}3-MST ou ETHE1 est injectée sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anion Q-Sépharose (agarose 6% sur laquelle sont fixés des groupements triméthylammonium chargés positivement) préalablement équilibrée avec du tampon A et couplée à un système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®). L'élution est réalisée en appliquant un gradient croissant de KCl (0 à 1 M) *via* l'utilisation du tampon D.

2) Production et purification des protéines recombinantes ^h3-MST, TSTD1 et GlpE

Contrairement à la ^{Ec}3-MST et ETHE1, ces protéines recombinantes sont produites avec une étiquette 6 x His présente à leur extrémité N-terminale.

a) Production et extraction des protéines recombinantes ^h3-MST, TSTD1 et GlpE

La GlpE et la TSTD1 sont produites dans une souche d'*E. coli* C41 (DE3) transformée par le plasmide pET28b GlpE/TSTD1 (ou par les plasmides pET28b TSTD1 mutés). Tandis que la ^h3-MST et ses mutants sont produits dans une souche BL21 (DE3) transformée par le plasmide pET28b ^h3-MST (ou par les plasmides pET28b ^h3-MST mutés). Les cultures sont ensemencées au 1/20^{ème} en milieu LB/K (0,5 mg/L de kanamycine) et placées à 37°C, sous agitation. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,8, l'expression est induite par ajout de 1 mM d'IPTG. Les cultures sont de nouveau incubées durant la nuit sous agitation permanente à 37°C. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g, puis lavées dans du tampon B. Elles sont centrifugées à 4000 g puis stockées à -20°C.

Le protocole de production de la ^h3-MST est le même à la différence que suite à l'induction à l'IPTG, les cellules sont placées à 20°C sous agitation pendant la nuit.

Les culots cellulaires sont repris dans 20 mL de tampon F, 20 U/mL de benzonase et 4 mM de MgSO₄. La lyse cellulaire est réalisée par sonication à 4°C sous une puissance de 40W par période de deux fois 2 minutes pendant 50% du temps. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 17000 g pendant 45 minutes.

b) Chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺

Le SSO est filtré à 0,22 µm avant injection sur colonne de chromatographie d'affinité Ni-Sepharose HP (15 mL, Amersham Biosciences) couplée à un système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®) et équilibrée avec du tampon F. La présence d'imidazole lors de la charge a pour but d'éviter la fixation non spécifique de protéines contaminants. L'échantillon protéique est ensuite injecté et l'élution est réalisée par un gradient croissant d'imidazole grâce au tampon G (de 0 à 1 M), l'imidazole va rentrer en compétition avec l'histidine permettant l'élution des protéines. Les fractions collectées sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE 12,5% et celles contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées.

A ce stade, la purification de la ^h3-MST est terminée puisque le degré de pureté est suffisant contrairement aux deux autres protéines recombinantes.

Matériels & Méthodes

c) Chromatographie échangeuse d'anions

Après une dialyse d'une nuit contre du tampon A sous flux continu d'azote, la solution est filtrée sur une membrane de 0,22 µm avant injection sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose (agarose 6% sur laquelle sont fixés des groupements triméthylammonium) préalablement équilibrée avec du tampon A et couplée à un système AKTA Avent (GE Healthcare). L'élution des protéines est réalisée par gradient croissant en KCl allant de 0 à 1M. Les fractions contenant la GIpE ou la TSTD1 sont ensuite rassemblées.

3) Production et purification de la protéine recombinante Rhodanèse humaine

a) Production et extraction de la protéine recombinante Rhodanèse humaine

La Rhodanèse est produite dans une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) transformée par le plasmide pET28b Rho selon le protocole LBNB (adapté de Oganessian *et al.*, 2007). La culture estensemencée au 1/40^{ème} en milieu LB supplémenté avec 0,5 mg/L de kanamycine puis elle est placée à 37°C, sous agitation jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne une valeur comprise entre 0,5 et 0,6. Il faut alors ajouter 0,5 M de NaCl, 2 mM de bétaïne et incuber la culture à 47°C pendant 1 heure sous agitation avant de la placer à 20°C également 1 heure sous agitation. C'est à ce stade que l'expression est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG. La culture est de nouveau réincubée à 20°C toute la nuit sous agitation. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g.

Les culots cellulaires sont repris dans 20 mL de tampon F. La lyse cellulaire est obtenue par sonication à 4°C, sous une puissance de 40W par période de deux fois deux minutes pendant 50% du temps. Les débris cellulaires sont éliminés grâce à une centrifugation à 20000 g pendant 30 minutes.

b) Chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺

Le SSO est filtré à 0,22 µm avant injection sur colonne de chromatographie d'affinité Ni-Sépharose couplée à un système FPLC ÄKTATM Avant (GE Healthcare®) et équilibrée avec du tampon F. L'échantillon protéique est ensuite injecté et l'élution est réalisée par un gradient croissant d'imidazole (de 0 à 1M), ce dernier va entrer en compétition avec les histidines (présentes sur le tag His) de la Rhodanèse et permettra ainsi l'élution des protéines. Les fractions collectées sont analysées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12,5% et celles contenant la Rhodanèse sont rassemblées.

c) Chromatographie échangeuse de cations

Après une dialyse d'une nuit contre du tampon A sous agitation et sous flux continu d'azote, la solution est filtrée sur une membrane de 0,22 μm avant injection sur une colonne échangeuse cationique de type SP-Sépharose HP de 25 mL (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée par du tampon H et couplée à un système FPLC ÄKTATM Avant (GE Healthcare®). L'élution des protéines est réalisée par gradient croissant en NaCl allant de 0 à 1 M *via* l'utilisation du tampon I. Les fractions contenant la Rhodanèse sont rassemblées.

4) Degré de pureté, stockage et préparation des protéines recombinantes avant utilisation

a) Gels bilan de purification des protéines

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) permet de suivre l'évolution du degré de pureté des protéines d'intérêts au cours des différentes étapes de purification. Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie R-250.

b) Stockage

La fraction protéique de ^{Ec}3-MST et ses différents mutants est dans un premier temps concentrée par ultrafiltration en cellule Amicon équipée d'une membrane YM 10 (MilliporeTM, limite d'exclusion de 10 kDa). Cette membrane retient toutes les macromolécules dont le poids moléculaire est supérieur à 10 kDa. Puis la ^{Ec}3-MST est précipitée avec 70% de SA en présence de 5 mM de DTT et le stocke protéique pourra ensuite être congelé à -20°C à une concentration d'environ 5 mg/mL.

Les protéines recombinantes purifiées ^h3-MST, TSTD1, Rhodanèse, GlpE et ETHE1 sont stockées dans leur tampon final de purification respectif à -80°C après concentration par ultracentrifugation sur membrane Amicon YM10 à une concentration finale comprise entre 4 et 30 mg/mL, et congelées immédiatement par immersion dans l'azote liquide. Les protéines d'intérêt sont stables pendant plusieurs semaines dans ces conditions.

Les concentrations molaires en protéines sont déterminées spectrophotométriquement en utilisant les coefficients d'extinction molaire à 280 nm de 51907 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 51910 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 11460 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 53400 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 12950 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et 7950 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour respectivement la ^{Ec}3- MST, la ^h3-MST, la TSTD1, la Rhodanèse, la GlpE et ETHE1.

Matériels & Méthodes

c) Préparation des protéines recombinantes avant utilisation

Avant utilisation, les protéines (sauvages et mutantes) sont incubées en présence de 5 mM de DTT à 4°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite dessalés, contre le tampon A pour les études d'activité réalisée sur toutes les enzymes à l'exception de la Rhodanèse pour laquelle le tampon E a été utilisé pour sa stabilisation. Ou le tampon L pour les études de dichroïsme circulaire, les dessalages ont été réalisés en utilisant une colonne de dessalage (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare).

Les formes persulfures des thioltransférases sont préparées par incubation préalable de l'enzyme en présence d'un excès de 5 fois de substrat donneur (3-mercaptopyruvate ou thiosulfate). L'excès de substrat est éliminé par la même stratégie que précédemment *via* l'utilisation de la colonne de dessalage.

IV. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes

1) Dosage des groupements thiols libres par le 5,5-dithiobis(2-nitro)benzoate

Le contenu en thiol libre (R-SH) des protéines recombinantes a été déterminé par réaction avec le 5,5-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB), en excès de 50 fois par rapport à l'enzyme dans le tampon A, en suivant l'apparition du thionitrobenzoate libéré à 412 nm ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Figure 81). La concentration en protéine est ajustée pour avoir un signal d'absorbance de 0,1 $\text{DO}_{412\text{nm}}$ par fonction thiol libre. En conditions dénaturantes (urée 1 M finale), l'expérience permet de doser la totalité des résidus Cys sous forme réduite pour l'ensemble des protéines recombinantes étudiées.

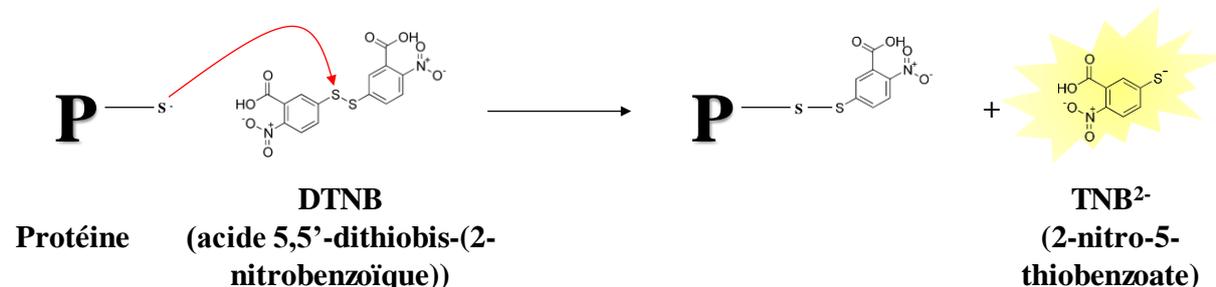


Figure 81. Dosage des groupements thiols libres par le DTNB.

Le contenu en thiol libres des protéines est déterminé par réaction avec le DTNB en suivant par spectrophotométrie à 412 nm l'apparition du thionitrobenzoate (TNB^{2-}) ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2) Evaluation de la polydispersité des solutions protéiques

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique non invasive de mesure du rayon hydrodynamique et de polydispersité de molécules en solution. Cette technique permet d'appréhender le comportement d'une protéine, solubilité *vs.* agrégation, dans une solution tampon donnée. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano S (Malvern). Un volume de 20 μ L de solution protéique a été utilisé à des concentrations allant de 5 à 200 mg/mL et à 30°C sachant que les échantillons ont été centrifugés 1 heure à 4°C à 12000 g préalablement à la mesure. Cette manipulation a été importante pour optimiser les conditions de purification de la TSTD1 sauvage, cette protéine devant être homogène en solution (indice de polydispersité faible) pour favoriser sa cristallisation en vue de l'obtention de la structure cristallographique.

3) Evaluation du contenu en structures secondaires des protéines recombinantes

Le dichroïsme circulaire est une technique permettant d'analyser le contenu en structures secondaires des macromolécules, et notamment des protéines en solution. Des spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés sur les protéines recombinantes purifiées, sauvage et mutées et ont permis notamment de vérifier que la présence des mutations n'affectait pas le contenu en structures secondaires de la protéine étudiée. Les mesures ont été enregistrées à l'aide d'un appareil Chirascan-plus (Applied photophysics) de 180 à 260 nm (UV lointains) selon un pas de 0,5 nm et à une température de 30°C. La cuve utilisée est une cuve en quartz présentant un trajet optique de 0,1 mm en présence du tampon L. Le blanc est réalisé contre le tampon L seul et six spectres sont réalisés pour chaque mesure et sont moyennés pour augmenter le rapport signal/bruit. L'ensemble des mutants étudiés présentent un spectre quasiment superposable à celui de la protéine sauvage correspondante indiquant ainsi que la variation des paramètres cinétiques des mutants n'est pas liée à une modification du contenu en structures secondaires et donc à une modification du repliement par rapport à la protéine non mutée.

Matériels & Méthodes

4) Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique nécessitant l'utilisation d'un échantillon ne présentant aucune trace de sels non volatils. Les protéines recombinantes ont été dessalées par une succession de dilution/concentration par ultrafiltration en cellule Amicon équipée d'une membrane YM 10 de 0,5 mL de contenance. La protéine ainsi dessalée est récupérée dans le tampon M. La fraction protéique est ensuite analysée à l'aide d'un spectromètre de masse de type électrospray (MicroTOF-Q Bruker Daltonics) en conditions dénaturantes afin de déterminer les masses moléculaires des protéines sauvages et mutées. Les analyses ont été réalisées par le Dr. Hortense Mazon au sein du service commun de spectrométrie de masse de l'UMR 7565 CNRS-UL, Institut Jean Barriol.

Les protéines recombinantes sauvages et mutées possèdent un poids moléculaire en cohérence avec leur composition en acides aminés.

5) Synthèse du glutathion persulfure (GSSH) et de la cystéine persulfure (CysSSH)

Le GSSH est un substrat donneur potentiel de la Rhodanèse et la CysSSH est un autre composé persulfure présent en quantité relativement importante dans l'organisme. Un prérequis à l'étude de la spécificité de substrats était de les synthétiser puis de les purifier, ces produits n'étant pas disponibles commercialement. La stratégie consiste à (1) activer le soufre du thiol (Cys ou GSH) par formation d'un intermédiaire RS-2TP. Cet intermédiaire est obtenu par réaction du thiol avec un léger sur-excès (X 1,5) de 2-PDS, un réactif chimique de second-ordre qui réagit avec les groupement thiolates. Il s'ensuit une étape de purification par chromatographie échangeuse d'anion (HiTrap Q HP), une élution isocratique en tampon A permet de séparer le 2-mercaptopyridine (2-TP) en excès et le produit d'intérêt. (2) Ensuite l'ajout d'un large excès de Na₂S (source d'H₂S en solution) (X 7) réagit avec le RS-2TP ce qui conduit à la formation du persulfure correspondant c'est-à-dire le GSSH quand le thiol de la première étape est le GSH et la CysSSH quand le thiol est la cystéine. Une étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique (SuperdexTM Peptide 10/300 GL) permet d'éliminer l'H₂S en excès et ainsi récupérer le composé persulfure pur. Une lyophilisation permet de conserver le produit de manière stable à 4°C (se référer à la Figure 45 des résultats). Le produit est ensuite quantifié par réaction d'un aliquote avec le dithiothréitol (DTT) suivie d'une

quantification de l'H₂S libéré *via* l'utilisation de l'électrode H₂S (Micro Sulfide Ion Electrode LIS-146AGSCM, Lazar Research Laboratories, INC.).

V. Caractérisation des propriétés enzymatiques des protéines recombinantes d'intérêts

1) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire

Au préalable à toute étude, l'échantillon protéique est centrifugé à 12000 g à 4°C afin d'éliminer les éventuels agrégats protéiques. La concentration en enzyme est calculée à partir de la densité optique à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire spécifique de la protéine étudiée.

a) Utilisation du système couplé Trx réductase/NADPH pour les 3-MST et la GlpE

Cette méthode nécessite que l'accepteur de soufre de l'enzyme soit la Trx, or seules les 3-MST humaine et bactérienne et la GlpE d'*E. coli* utilisent la Trx comme substrat. L'activité de ces protéines recombinantes sauvages et des mutants 3-MST a été mesurée dans le tampon A à 30°C en utilisant la Trx1 d'*E. coli* comme réducteur. Ceci permet de coupler la réaction au système Trx réductase (NTR) d'*E. coli*/NADPH, et de suivre la réaction au cours du temps à 340 nm *via* la consommation de NADPH à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UVmc2 (Safas, Monaco) (Figure 82 A). La Trx et la NTR d'*E. coli* ont été produites et purifiées au laboratoire selon le protocole décrit dans la littérature (Mulrooney, 1997 ; Mössner *et al.*, 1998). Le bruit de fond est préalablement établi en suivant la diminution de la DO_{340 nm} au cours du temps en absence de la thioltransférase. Cette diminution est due à l'oxydation du NADPH par la NTR dont les centres redox ont été oxydés ainsi qu'à une réaction de deuxième ordre entre la Trx1 et le 3-MP. Cette vitesse est soustraite à la vitesse de réaction déterminée en présence de l'enzyme étudiée.

Le mélange réactionnel contient : le 3-MP (concentration variable) (SantaCruz), la Trx (concentration variable), la NTR (1,25 µM), le NADPH (0,3 mM) (Roche) et une 3-MST (de 10 nM à 10 µM) ou la GlpE (10 µM) dans du tampon A. Les mesures d'activité ont été réalisées en faisant varier soit la concentration en 3-MP, la concentration en Trx étant saturante pour la mesure du K_M du 3-MP ; soit la concentration en Trx, la concentration en 3-MP étant saturante

Matériels & Méthodes

pour mesurer le K_M de la Trx. Les valeurs expérimentales ont été ajustées avec le logiciel SciDAVis 1.D013 à l'équation de Michaelis-Menten (Équation 1) pour la ^{Ec3}-MST et à l'équation de Hill (Équation 2) pour la ^{h3}-MST et la GlpE.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{cat}} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Équation 1. Equation de Michaelis-Menten.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{cat}} \times [S]^n}{K_M^n + [S]^n}$$

Équation 2. Equation de Hill.

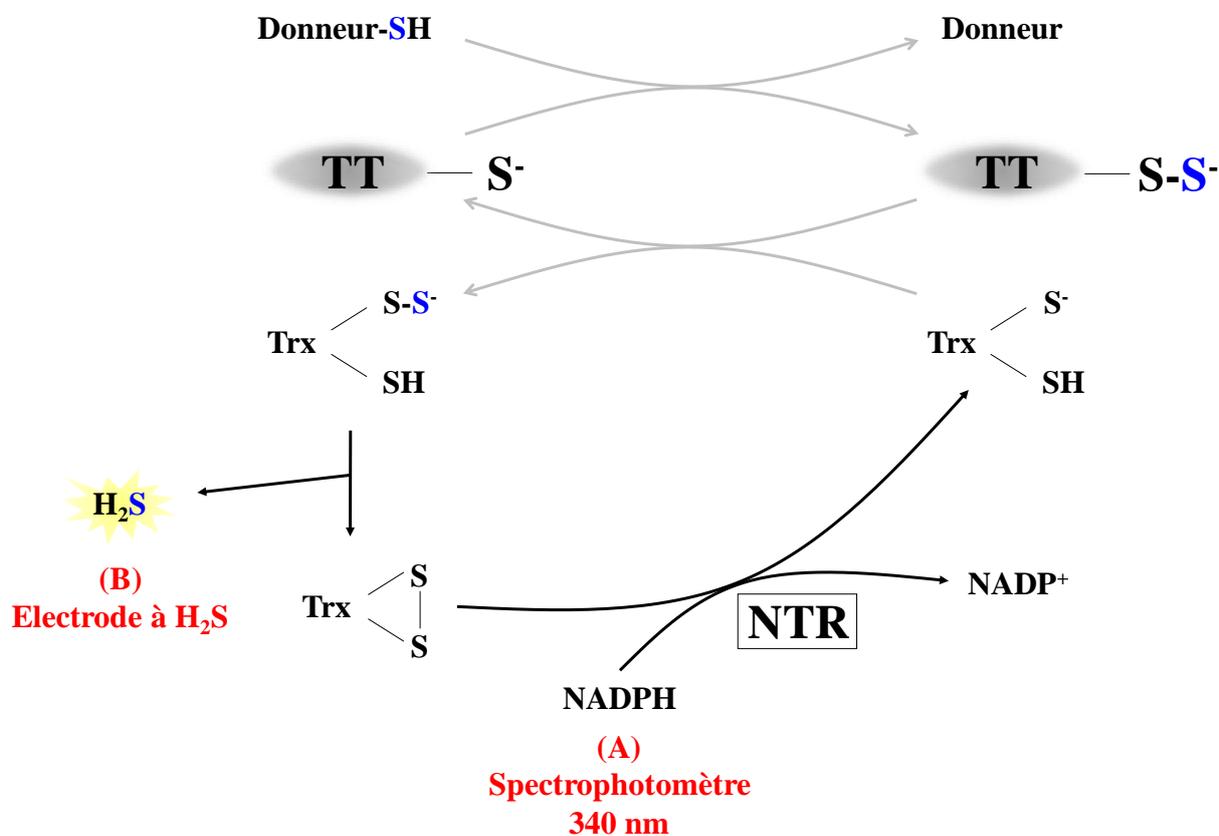


Figure 82. Système couplé NTR/NADPH (A) et suivi de la production d' H_2S avec l'électrode (B) pour mesurer les paramètres cinétiques à l'état stationnaire des formes sauvages et des mutants des thioltransférases.

A : Le suivi de l'oxydation du NADPH à 340 nm reflète l'activité de l'enzyme étudiée à la condition que le système couplé ne soit pas limitant. Les constantes de vitesse sont calculées en utilisant un coefficient d'extinction molaire pour le NADPH de $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

B : En présence de la Trx, le suivi de la production d' H_2S reflète l'activité de la thioltransférase car la libération d' H_2S est concomitante à la formation de la Trx sous forme pont disulfure intramolécule. L'électrode est la technique utilisée comme test d'activité à l'état stationnaire pour les thioltransférases n'utilisant pas la Trx comme substrat. Les constantes de vitesses sont calculées grâce à l'utilisation d'une gamme étalon.

b) Utilisation d'une électrode H₂S pour les thioltransférases

Cette méthode nécessite que l'accepteur de soufre soit un accepteur à thiol qui permet la libération d'H₂S par les thioltransférases (Figure 82 B). La mesure de la réaction à l'état équand celui-ci est utilisé comme accepteur de soufre.

La méthode repose sur l'utilisation d'une électrode (Micro Sulfide Ion Electrode LIS-146AGSCM, Lazar Research Laboratories, INC.) quantifiant spécifiquement l'H₂S, couplée au logiciel Arrow Ion TM Plotter (Demo 6230M) (Figure 83). En effet, le voltage mesuré par cette électrode peut être converti en concentration d'H₂S présente dans la solution à l'aide d'une gamme étalon. Celle-ci est établie en utilisant une solution de Na₂S qui libère ce gaz. Les solutions d'étalonnage sont préparées par dilution de la solution mère dans du tampon A et permettent l'obtention d'une gamme de concentration de 10⁻² à 10⁻⁶ M en H₂S. La mesure du voltage pour chaque solution d'étalonnage permet d'obtenir une droite d'équation logarithmique (Équation 3).

$$\text{Voltage} = -67,8 \times \ln[\text{H}_2\text{S}] - 1272,6$$

Équation 3. Equation de la droite de calibration de l'électrode à H₂S permettant la conversion du voltage obtenu en concentration molaire de sulfure d'hydrogène.

La mesure de la vitesse initiale de libération d'H₂S se fait en deux temps : un bruit de fond est déjà établi en mettant en présence l'accepteur à thiol et le substrat donneur dans du tampon A. Après une minute de pré-incubation, la thioltransférase est ajoutée au mélange à une concentration comprise entre 10⁻⁸ et 10⁻⁴ M et une pente [E]-dépendante est mesurée. Les valeurs de vitesse initiale sont obtenues par la soustraction (pente [E]-dépendante) – (pente de la réaction « parasite ») et ont ensuite été ajustées à l'équation de Michaelis-Menten (Équation 1) quand la courbe a un profil hyperbolique ou à l'équation de Hill (Équation 2) quand la courbe a un profil sigmoïdal.

L'H₂S peut être également un substrat accepteur pour les thioltransférases, cette réaction conduisant potentiellement à la transformation d'H₂S en H₂S₂, a pu être suivie en utilisant la sonde. Dans ce cas, la réaction s'accompagne d'une variation de voltage [E]-dépendante et inverse aux variations mesurées lors de la production d'H₂S. Les mesures sont effectuées de la même manière que précédemment dans du tampon O avec l'établissement préalable d'un blanc en présence de concentrations saturantes de thiosulfate et de concentrations variables d'H₂S. Puis une concentration de 0,5 à 5 µM d'enzyme est ajoutée et les valeurs de vitesse initiale sont

Matériels & Méthodes

obtenues par la soustraction (pente [E]-dépendante) – (pente de la réaction « parasite ») et ont ensuite été ajustées à l'aide du logiciel SciDAVis 1.D013 à l'Équation 1.

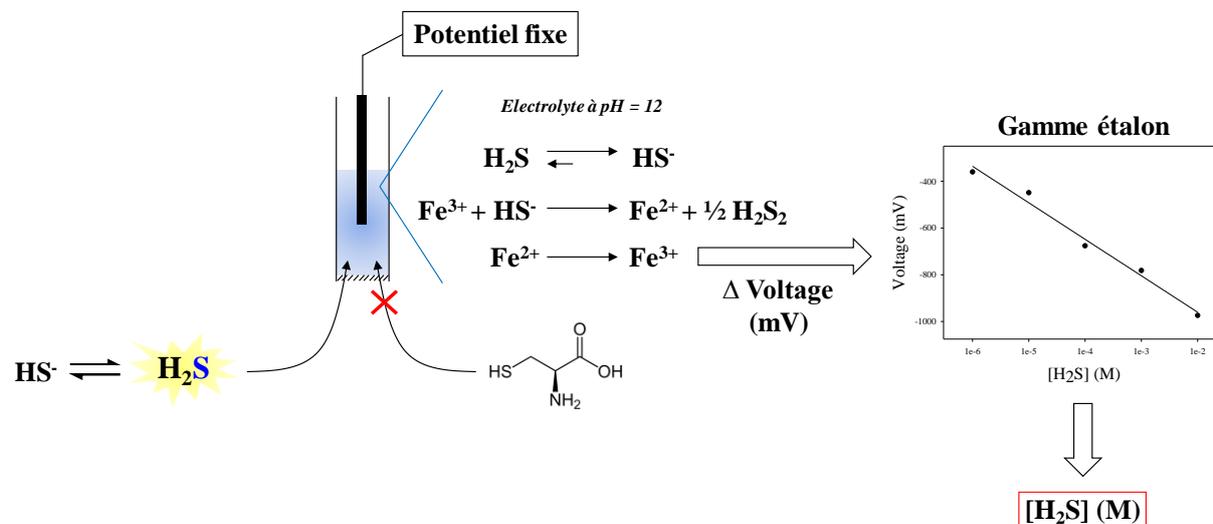


Figure 83. Principe de fonctionnement de l'électrode sélective à H₂S.

La mesure de la concentration en sulfure d'hydrogène est basée sur la mesure du voltage, celui-ci étant modifié en présence d'H₂S par réaction, dans un électrolyte basique (pH = 12), de l'HS⁻ avec le Fe³⁺. La réaction d'oxydoréduction conduit à la reformation de Fe³⁺ ce qui entraîne une variation du voltage. La détection est donc basée sur la réoxydation du ferrocyanure (FerII) provenant de la réduction à pH 12 du ferricyanure (FerIII) par HS⁻. L'utilisation d'une gamme étalon permet de transformer les valeurs de voltage en concentrations molaires. La sélectivité pour le sulfure d'hydrogène est assurée par une membrane perméable (représentée sur le schéma en hachuré) uniquement aux molécules apolaires de petite taille telle que l'H₂S.

c) Suivi de la formation potentielle d'H₂S₂ par les thioltransférases par spectrophotométrie

Comme énoncé précédemment, l'H₂S pourrait être un accepteur de soufre pour certaines thioltransférases. Cette réaction a été suivie à l'état stationnaire par l'électrode à H₂S. Une autre stratégie consistait à suivre la formation d'H₂S₂ à une longueur d'onde de 372 nm comme c'est décrit dans la littérature (Greiner *et al.*, 2013). La manipulation est effectuée dans une cuve en quartz dans le tampon O en présence de 2,5 à 5 μM de thioltransférase, une concentration saturante de substrat donneur et une concentration d'H₂S allant de 50 μM à 10 mM. La vitesse initiale est mesurée par l'utilisation d'un coefficient d'absorption ε_{372nm} de 683 M⁻¹.cm⁻¹ (Everett et Wardman, 1995). Cette technique est moins précise que la méthode utilisant l'électrode à H₂S, ainsi elle a été employée uniquement pour valider la première approche sur quelques essais enzymatiques.

Matériels & Méthodes

Pour la ^h3-MST, la réaction est stoppée par l'ajout de 50% d'acétate d'éthyle (l'urée, un acide fort ou du chlorure de guanidinium seuls n'étant pas suffisants pour stopper la réaction) et une étape de centrifugation permet ensuite d'éliminer la phase organique et donc de récupérer la phase contenant le sulfite à doser. La réaction est réalisée en présence de concentrations variables en sulfite, de 7,5 mM de 3-MP (concentration saturante) et de 31 nM de ^h3-MST. Tandis que pour la Rhodanèse, la réaction enzymatique est stoppée suite à l'ajout de 4 M d'urée. La réaction est réalisée en présence de concentrations variables de sulfite, de 3,5 mM de GSSH (concentration saturante, préparé selon le protocole décrit précédemment) et 1,22 µM d'enzyme.

Cette méthode permet ainsi de mesurer la concentration de sulfite consommée au cours du temps par l'utilisation de l'Équation 4, ce qui permet d'avoir la vitesse initiale.

$$\text{Abs}_{340\text{nm}} = 0,0266 \times \text{Masse}_{\text{Sulfite}} - 0,0012$$

Équation 4. Equation de la droite de calibration du kit SO permettant la conversion de l'absorbance à 340 nm en masse de sulfite.

Puis les paramètres cinétiques de l'enzyme pour ce substrat à l'état stationnaire sont déterminés, après ajustement des données expérimentales à l'aide du logiciel SciDAVis 1.D013 à l'Équation 1 pour la ^h3-MST et à l'Équation 2 pour la Rhodanèse.

e) Utilisation de l'électrode pO₂ pour suivre l'activité d'ETHE1

L'enzyme ETHE1 humaine n'est pas une thioltransférase. Comme énoncé dans l'introduction, elle appartient à la famille des dioxygénases. Cette enzyme catalyse l'oxydation O₂-dépendante du GSSH en sulfite. Dans ce contexte, deux solutions étaient possibles pour suivre son activité à l'état stationnaire afin de valider son activité : (1) mesurer la disparition de l'O₂ et/ou (2) mesurer l'apparition du sulfite.

Dans un premier temps, la stratégie a reposé sur l'utilisation d'une électrode (Micro dissolved oxygen electrode, Lazar Research Laboratories, INC.) quantifiant spécifiquement le dioxygène, couplée au logiciel Arrow Ion TM Plotter (Demo 6230M). La réaction est réalisée en présence de concentrations variables en GSSH et de 5 µM d'enzyme ETHE1. Dans ces conditions, une pente [ETHE1]-dépendante est mesurée et la disparition de l'O₂ au cours du temps est suivie par le logiciel Arrow Ion TM Plotter. Les données brutes mesurées sont des pourcentages d'O₂ dans la solution et l'utilisation de l'Équation 5 permet la conversion du pourcentage d'O₂ en mol/L, où a est le coefficient d'absorption de l'O₂ à la température donnée et p la pression de vapeur de l'eau à la température donnée.

$$[O_2] = \left(\frac{a}{22,414}\right) \times ((760 - p)/(760)) \times \left(\frac{\%O_2}{100}\right)$$

Équation 5. Equation de calibration de la microélectrode de Clark permettant la conversion du pourcentage d'O₂ en concentration molaire d'oxygène.

Cette stratégie permet donc de suivre la concentration d'O₂ consommée au cours du temps ce qui permet d'avoir la vitesse initiale et donc les paramètres cinétiques de l'enzyme à l'état stationnaire par ajustement des données expérimentales à l'Équation 1.

2) Mesure du pKa de la cystéine catalytique dans l'enzyme libre par spectrophotométrie

C'est une méthode directe visant à titrer l'absorbance du groupement thiolate à 240 nm en fonction du pH. Les spectres d'absorbance ont été mesurés pour toutes les enzymes dans une cuve de 1,0 cm de trajet optique par l'utilisation d'un spectrophotomètre SAFAS UVmc². L'échantillon protéique a été dilué dans du tampon P de force ionique constante. Le spectre est effectué à 30°C de 200 à 300 nm avec des incréments de 0,5 nm. Un blanc est préalablement effectué contre la solution tampon seule et le spectre en présence de la protéine est réalisé dans la même cuve. Un spectre du mutant cystéine est réalisé en parallèle puis les deux spectres sont soustraits et la différence de coefficient molaire d'absorption à 240 nm (ϵ_{240nm}) est ajusté en fonction du pH. Les données expérimentales ont été ajustées à l'Équation 6.

$$\epsilon_{240nm} = \epsilon_{SH} + \left(\frac{\epsilon_{S-} - \epsilon_{SH}}{1 + 10^{(pKa-pH)}}\right)$$

Équation 6. Equation d'ajustement mono-sigmoïdal utilisée pour le traitement des données obtenues lors des expériences de titration directe du groupement thiolate en fonction du pH.

3) Etudes à l'état pré-stationnaire de la première étape de transfert de soufre des thioltransférases

a) *Spectres de fluorescence des thioltransférases*

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la forme sauvage des thioltransférases sous forme réduite ou persulfure ont été enregistrés à 30°C à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS Flx-Xenius avec une concentration en enzyme de 10 µM dans le tampon A. La forme persulfure des thioltransférases est générée par réaction de l'enzyme en présence d'un excès de 5 fois de 3-mercaptopyruvate ou de thiosulfate suivi d'un dessalage par l'utilisation d'une colonne de dessalage (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare) permettant l'élimination du substrat en excès.

Matériels & Méthodes

Les spectres d'émission ont été obtenus pour une longueur d'onde d'excitation de 287 et 284 nm respectivement pour la ^{Ec}3-MST/^h3-MST/Rhodanèse et la GlpE/TSTD1. Et une longueur d'onde d'émission variant de 300 à 400 nm par incrément de 1 nm avec un photomultiplicateur réglé à 550 V. Les spectres d'excitation ont été obtenus quant à eux pour une longueur d'onde d'émission de 335, 330, 329, 315 et 322 nm pour respectivement la ^{Ec}3-MST, la ^h3-MST, la TSTD1, la GlpE et la Rhodanèse. Et une longueur d'onde d'excitation variant de 250 à 300 nm avec un photomultiplicateur réglé à 550 V.

Ces spectres de fluorescence ont permis de montrer que les formes thiol et persulfure des thioltransférases possèdent des propriétés de fluorescence intrinsèquement différentes, ces variations ont été ensuite mises à profit pour étudier les étapes de transfert de soufre.

b) Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre du substrat donneur vers la thioltransférase par suivi de la variation de la fluorescence intrinsèque

La stratégie consistait à exploiter les variations de la fluorescence intrinsèque de l'enzyme entre les formes réduite et persulfure observées lors de la réalisation des spectres de fluorescence. Cette étude a été conduite dans des conditions de cycle catalytique unique (c'est-à-dire en absence de l'accepteur de soufre) et les cinétiques ont été suivies à l'aide d'un appareil de cinétique à mélange rapide (Stopped-Flow SX19MV-R, Applied Photophysics), qui permet de suivre la variation de l'émission de fluorescence du mélange réactionnel sur des temps courts (Figure 85 A). La première seringue contient la thioltransférase (1-20 µM selon les cas) dans du tampon A et la deuxième contient une concentration variable de substrat donneur (3-MP, thiosulfate, GSSH ou CysSSH) dans le même tampon alors que la température est maintenue à 30°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm pour la TSTD1 ou à 295 nm pour les autres thioltransférases, afin d'exciter notamment les résidus Trp de l'enzyme, et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm. Les cinétiques observées ont été ajustées à l'Équation 7, à l'aide du logiciel Pro-Data SX (Applied Photophysics) où k_{obs} représente la constante de vitesse associée à la phase exponentielle décroissante, I_F l'intensité de fluorescence au temps t et I_F^{max} l'amplitude maximale du signal.

$$I_F = I_F^{max} \times e^{(-k_{obs} \times t)} + a \times t + b$$

Équation 7. Equation d'ajustement du signal de fluorescence à une exponentielle décroissante couplée à une droite.

Les profils $k_{\text{obs}} = f([\text{donneur}])$ ont ensuite été ajustés par régression non linéaire à l'équation d'une hyperbole (Équation 8) à l'aide du logiciel SciDAVis 1.D013, k_{max1} correspondant à la constante de vitesse maximale de la première étape et K à une constante d'affinité apparente.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{max1}} \times [S]}{K + [S]}$$

Équation 8. Equation d'ajustement hyperbolique utilisée pour traiter les données expérimentales obtenues lors de l'étude de la première étape de transfert de soufre par suivi de la fluorescence intrinsèque de l'enzyme.

c) Etude de la première étape en fonction du pH

Par ailleurs des expériences d'étude de la première étape en fonction du pH ont été réalisées afin de titrer un ou plusieurs $pK_a(s)$ de groupements chimiques potentiellement impliqués dans la catalyse. Cette étude a été réalisée dans du tampon P à force ionique constante en présence d'une concentration saturante du 3-MP. La constante de vitesse maximale de la première étape a ensuite été ajustée en fonction du pH à l'Équation 9 permettant l'obtention de la constante de vitesse maximale obtenu à pH optimal k_{lim} et la pK_a du groupement titré.

$$k_{\text{max1}} = \frac{k_{\text{lim}}}{1 + 10^{(pK_a - \text{pH})}}$$

Équation 9. Equation d'ajustement mono-sigmoïdal utilisée pour le traitement des données expérimentales obtenues par étude de la première étape en fonction du pH.

d) Quantification du pyruvate formé par la ^{Ec}3-MST en utilisant un Quenched-flow couplé à une chromatographie en phase inverse C18

Pour réaliser cette quantification, une gamme étalon a été établie en utilisant des concentrations de pyruvate (Sigma Chemical) variant de 25 μM à 500 μM en présence de 2 mM de 3-MP (Aldrich Chemistry), dont l'équation est la suivante (Équation 10) :

$$\text{Aire sous le pic}_{215 \text{ nm}} = 0,362 \times [\text{Pyruvate}] + 6,424$$

Équation 10. Equation de la droite de calibration permettant de déterminer la concentration en pyruvate formé par chromatographie en phase inverse C18.

La forme sauvage de la ^{Ec}3-MST et le mutant H66A (300 μM et 340 μM) ont été mis en présence de 3-MP (2 mM) durant des temps variables allant de 2,5 ms à 10 s. La réaction est stoppée par acidification du milieu réactionnel à l'aide d'acide perchlorique 3% final grâce à l'utilisation d'un appareil de mélange rapide (Quenched-Flow RQF-3, KinTek Corporation, Austin) (Figure 85 B). Une centrifugation est ensuite réalisée afin d'éliminer l'enzyme précipitée et le surnageant est injecté sur une colonne C18 Atlantis (Waters) couplée à un système Aktä Explorer (GE Healthcare). L'élution a été réalisée grâce à un flux isocratique de

Matériels & Méthodes

tampon J et la détection est réalisée en suivant l'absorbance à 215 nm. La colonne est lavée par l'utilisation du tampon K par l'établissement d'un gradient d'acetonitrile allant de 0 à 80%. L'intégration du pic de pyruvate permet grâce à la gamme étalon de mesurer la concentration en pyruvate formée en fonction du temps. L'ajustement de la courbe [Pyruvate] = f (t) à l'Équation 11, permet de déterminer la constante de vitesse k_{obs} associée à la formation du pyruvate ainsi que la constante de vitesse d'un événement se déroulant après la fin du premier cycle catalytique de l'enzyme.

$$[\text{Pyruvate}] = [\text{Pyruvate}]_{\text{max}} \times (1 - e^{(-k_{\text{obs}} \times t)}) + a \times t + b$$

Équation 11. Equation d'ajustement à une exponentielle croissante couplée à une droite utilisée pour l'étude de la première étape de transfert de soufre par quantification du pyruvate formé.

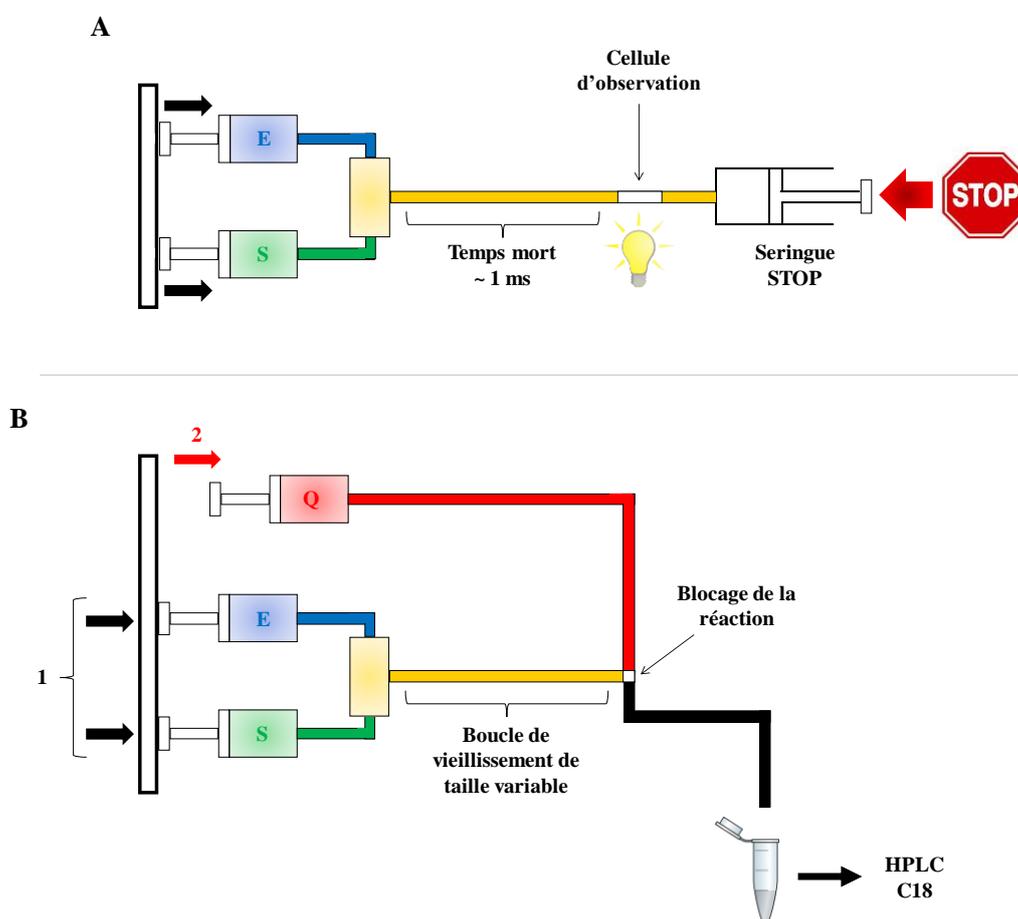


Figure 85. Principe de fonctionnement des appareils de cinétique rapide de type stopped-flow (A) et quenched-flow (B).

A : L'appareil permet de mélanger instantanément le contenu de deux seringues et la réaction est suivie à partir de la première milliseconde (temps mort de l'appareil).

B : Une première poussée est effectuée par le moteur (1) afin de permettre le mélange entre le 3-MP et la $^{Ec}3\text{-MST}$. Puis la réaction est stoppée par acidification du mélange réactionnel suite à la poussée de la seringue contenant l'acide perchlorique (2). Ce mélange est alors récolté puis injecté sur HPLC C18 phase inverse.

E, S et Q symbolisent respectivement l'enzyme, le substrat et l'agent bloquant (acide ou base forte par exemple).

Cette stratégie avait pour but de valider la méthode précédente exploitant la fluorescence intrinsèque de l'enzyme pour suivre la réaction de la première étape de transfert de soufre des thioltransférases.

e) Mesure des effets isotopiques de solvant lors de la première étape

Pour déterminer les effets isotopiques cinétiques de solvant (SKIE), le tampon A ainsi que l'enzyme ont été préalablement lyophilisés et repris dans de l'oxyde de deutérium (D₂O). Le pH du tampon A a été préalablement ajusté à 7,6 de manière à avoir un pD de 8,0, la correction étant effectuée selon l'égalité suivante : pD = pH mesuré + 0,4. Tous les réactifs ont été préparés dans du D₂O de manière extemporanée et aucune différence n'a été observée sur le spectre U.V. ou sur l'activité des thioltransférases. Les expériences ont été réalisées de la même manière que pour l'étude de la première étape ainsi que c'est décrit précédemment. Les expériences d'étude d'effet isotopique ont été réalisées pour une concentration saturante en 3-MP et une concentration équivalente au K_{3-MP} mesuré sur la première étape et les manipulations ont été reproduites plusieurs fois.

Par ailleurs, des expériences d'inventaire de protons ont été réalisées afin de déterminer le nombre de protons impliqués dans la catalyse de la première étape de transfert de soufre en présence de 3-MP. Cette étude a été réalisée de la même manière que précédemment à 30°C avec un pD de 8,0, par étude de la réaction dans des solutions comprenant des ratios D₂O/H₂O variables. La détermination de la valeur de k_n/k_0 en fonction du ratio en D₂O (n) a permis de déterminer le nombre de protons (n) impliqué dans la catalyse et le facteur de fractionation ϕ , après ajustement des données expérimentales à l'équation simplifiée de Gross-Butler (Équation 12) où k_n et k_0 correspondent aux constantes de vitesse de la première étape respectivement en présence de D₂O et d'H₂O.

$$\frac{k_n}{k_0} = ((1 - x) \times (x^\phi))^n$$

Équation 12. Equation simplifiée de Gross-Butler.

4) Mesure de la constante de vitesse de libération du pyruvate k_{off}

La manipulation consiste à mesurer la constante de vitesse de libération du pyruvate à partir du complexe binaire 3-MST persulfure/pyruvate en utilisant le système couplé lactate déshydrogénase (LDH)/NADH avec le stopped-flow. Une seringue contient 1,25 μ M de LDH

Matériels & Méthodes

et 300 μM de NADH dans du tampon A et l'autre contient 5 μM de pyruvate et 2,5 μM de 3-MST persulfure dans le même tampon (sauf pour les contrôles). Les données expérimentales sont ajustées à une équation biphasique (Équation 13).

$$A_{340} = A_{340\text{max1}} \times (e^{(-k_{\text{obs1}} \times t)}) + A_{340\text{max2}} \times (e^{(-k_{\text{obs2}} \times t)})$$

Équation 13. Equation d'ajustement bi-exponentiel utilisée pour déterminer le k_{off} du pyruvate et la vitesse de la deuxième étape de transfert de soufre en présence de Trx.

La phase rapide correspond à l'utilisation du pyruvate libre (dont la constante de vitesse est k_{obs1}) et la phase lente correspond à la libération du pyruvate à partir du complexe binaire 3-MST persulfure/pyruvate (dont la constante de vitesse est $k_{\text{obs2}} = k_{\text{off}}$).

5) Déterminations des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire de la deuxième étape de transfert de soufre des thioltransférases

a) *Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre de la ^h3-MST vers la Trx*

Comme pour la première étape, la réaction a été étudiée dans des conditions de cycle catalytique unique, c'est-à-dire en utilisant la 3-MST sous forme persulfure et la Trx sous forme réduite. La stratégie initiale consistait à exploiter les propriétés de fluorescence liées au passage de la Trx de la forme réduite à oxydée par excitation à 310 nm. Cette stratégie a permis d'obtenir les paramètres cinétiques de la deuxième étape pour la GlpE mais aucune variation de fluorescence Trx-dépendante n'a été observée avec la 3-MST.

Une alternative a consisté à utiliser le système couplé NTR/NADPH dans des conditions de cycle catalytique unique. Dans un premier temps, la constante de vitesse de la réaction catalysée par le système couplé seul a été déterminée par le suivi de la disparition du NADPH à 340 nm à l'aide d'un appareil de cinétique à mélange rapide (Stopped-Flow SX19MV-R, Applied Photophysics) à 30°C. La première seringue contenait 37,5 μM de NTR dans du tampon A et la seconde 0,3 mM de NADPH, 10 μM de Trx, préalablement oxydée par l'ajout d'une quantité stœchiométrique d' H_2O_2 , et du tampon A. Dans ces conditions, la constante de vitesse du système couplé est d'environ 20 s^{-1} .

La constante de vitesse associée à l'étape de transfert de soufre de l'intermédiaire persulfure vers la Trx a été mesurée selon un protocole similaire à celui décrit pour le système couplé seul. La manipulation est réalisée en deux temps : (1) un blanc est établi au préalable en présence de 37,5 μM de NTR dans la première seringue et de 0,3 mM de NADPH en présence de

concentrations variables de Trx réduite dans la seconde seringue. Ce signal d'absorbance correspond au bruit de fond de la réaction dû à l'oxydation du NADPH par la NTR dont les centres redox ont été oxydés. (2) Dans cette deuxième condition, la première seringue contenait 37,5 µM de NTR, la 3-MST sous forme persulfure à une concentration variable (5 µM pour des concentrations en Trx supérieures à 50 µM) dans du tampon A et la seconde contenait la Trx (concentrations variables en excès *a minima* de 5 fois par rapport à l'enzyme), 0,3 mM NADPH et du tampon A. La méthode consiste à mesurer la diminution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps par un appareil de cinétique à mélange rapide de type stopped-flow.

Le signal d'absorbance obtenu pour la manipulation (2) est soustrait au signal obtenu pour la manipulation (1) qui constitue le bruit de fond de la réaction.

Les cinétiques de diminution de l'absorbance à 340 nm ont été ajustées à l'équation d'une bi-exponentielle (Équation 13, dans laquelle la constante de vitesse de la deuxième étape correspond au k_{obs1} et la constante de vitesse de la deuxième phase plus lente correspond à une réaction secondaire entre la NTR et HS⁻) à l'aide du logiciel Pro-Data SX (Applied Photophysics). Les profils $k_{obs} = f([Trx])$ ont été ajustés par régression non linéaire à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) où k_{max2} est la constante de vitesse maximale associée à la réaction de transfert de soufre de l'enzyme vers l'accepteur et K une constante d'affinité apparente pour le substrat.

$$k_{obs} = \frac{k_{max2} \times [S]}{K + [S]}$$

Équation 14. Equation d'ajustement hyperbolique utilisée pour l'étude de la deuxième étape.

b) Etude cinétique de la réaction de transfert de soufre de l'intermédiaire persulfure de la thioltransférase vers le substrat accepteur

La stratégie utilisée a été la même que pour l'étude de la première étape de transfert de soufre. Le signal de fluorescence lié au passage de la forme persulfure de l'enzyme à l'accepteur est inverse du signal mesuré pour la première étape. La première seringue contient la thioltransférase sous forme intermédiaire persulfure (1-20 µM selon les cas) dans du tampon A et la deuxième contient une concentration variable de substrat accepteur dans le même tampon alors que la température est maintenue à 30°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm pour la TSTD1 ou à 295 nm pour les autres thioltransférases et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm. Les cinétiques observées ont été ajustées à l'Équation 15, à l'aide du logiciel Pro-Data SX (Applied Photophysics) où k_{obs} représente la constante de vitesse associée à la phase exponentielle

Matériels & Méthodes

décroissante, I_F l'intensité de fluorescence au temps t et I_F^{\max} l'amplitude maximale du signal. Les profils $k_{\text{obs}} = f$ ([accepteur]) ont ensuite été ajustés par régression non linéaire à l'équation d'une hyperbole (Équation 14) à l'aide du logiciel SciDAVis 1.D013.

$$I_F = -I_F^{\max} \times e^{(-k_{\text{obs}} \times t)} + a \times t + b$$

Équation 15. Equation d'ajustement du signal de fluorescence à une exponentielle croissante couplée à une droite.

La réaction de transfert de soufre de la GlpE persulfure vers la Trx a été étudiée *via* l'utilisation d'une autre stratégie. La Trx étant un substrat protéique, l'excitation a été réglée à 310 nm de manière à exciter spécifiquement la Trx. Or le passage de la Trx sous forme réduite à la forme pont disulfure s'accompagne d'une baisse de la fluorescence intrinsèque de la protéine. C'est ce signal qui a été suivi en utilisant le stopped-flow, les traces de fluorescences ont été ajustées à l'équation d'une exponentielle décroissante couplée à une droite. La réaction a été réalisée en présence de 10 μM de GlpE persulfure et de concentrations variables en Trx. Les profils $k_{\text{obs}} = f$ ([Trx]) ont ensuite été ajustés par régression linéaire puisque la saturation n'a pas été atteinte du fait d'un K_{Trx} trop élevé ($> 100 \mu\text{M}$), cet ajustement a permis l'obtention de la constante de deuxième ordre $k_{\text{max}2}/K_{\text{Trx}}$.

VI. Techniques d'étude des complexes protéiques

1) Quenching de fluorescence

Le principe de cette technique repose sur l'exploitation de la fluorescence des Trp de l'un des partenaires *via* la mesure du quenching de fluorescence associée à l'interaction entre les deux partenaires. Par conséquent cette stratégie n'est utilisable qu'à condition que l'un des deux partenaires soit dépourvu de résidus Trp et la fluorescence intrinsèque de l'autre partenaire est de ce fait mis à profit.

Un spectrofluorimètre SAFAS Flx-Xénius a été utilisé pour mesurer la variation de l'intensité d'émission de fluorescence. Les spectres d'émission de fluorescence ont été réalisés sur des longueurs d'onde comprises entre 300 et 400 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 295 nm. Les expériences ont été conduites en présence d'une agitation constante dans du tampon A. Un volume de 2 mL de solution est placé dans une cuve en quartz contenant 5 μM de TSTD1, 1 μM de 3-MST, 5 μM de Rhodanèse ou 5 μM de Trx dans du tampon A. La titration a été

effectuée par addition successive de la protéine ETHE1 (protéine sans Trp) jusqu'à atteindre une saturation. Un photomultiplicateur (PM) de 700, 650, 590 et 825 V ont été utilisés pour l'amplification des signaux de fluorescence respectivement de la TSTD1, la ^h3-MST, la Rhodanèse et la Trx. Les émissions à des longueurs d'onde de 336, 330, 322 et 350 nm respectivement pour la TSTD1, la ^h3-MST, la Rhodanèse et la Trx, ont été corrigées en tenant compte du facteur de dilution. Ces valeurs ajustées ont été tracées en fonction de la concentration en ETHE1 et les données expérimentales ont été ajustées par régression non linéaire à l'équation d'une hyperbole selon l'Équation 16 par l'utilisation du logiciel SciDAVis 1.D013, où le F_{\max} correspond à la valeur de diminution maximale de la fluorescence et K_D la constante de dissociation.

$$F = \frac{F_{\max} \times [\text{ETHE1}]}{K_D + [\text{ETHE1}]}$$

Équation 16. Equation d'ajustement hyperbolique utilisée pour traiter les données expérimentales de « quenching de fluorescence » analysées selon un modèle d'interaction à un site.

2) Anisotropie de fluorescence

Le « quenching » de fluorescence est une technique indirecte car impliquant le suivi de la fluorescence intrinsèque de l'un des partenaires. Par conséquent, il était nécessaire de confirmer les résultats obtenus par une autre méthode telle que l'anisotropie de fluorescence. Puisque les résidus Trp ne sont pas des fluorophores présentant des propriétés adaptées à ce type de mesures (coefficient d'extinction et rendement quantique faibles puis longueur d'onde d'émission trop basse) ; il était nécessaire de marquer l'une des deux protéines par une sonde fluorescente et de suivre le signal d'anisotropie de fluorescence de la protéine marquée en fonction de l'ajout de concentrations croissantes du partenaire non marqué.

La fonction amine à l'extrémité N-terminale de la protéine ETHE1 a été modifiée par incubation en présence d'un excès molaire de 10 fois de la sonde fluorescente Alexa® 488 5-SDP ester dans du tampon N (Molecular probes, Life technologies) (Figure 86) pendant 10 minutes à température ambiante. La sonde fluorescente a été préalablement diluée dans du DMSO afin de la solubiliser. Le milieu réactionnel à pH 8 permet de favoriser la réaction du groupement amine N-terminal par rapport aux fonctions amines des chaînes latérales des résidus lysine. La protéine marquée est séparée de l'excès de sonde par dessalage sur colonne (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare) contre du tampon A. Les concentrations en protéine ainsi que le degré de marquage sont déterminés selon les instructions du fournisseur.

Matériels & Méthodes

L'intensité de fluorescence et les mesures d'anisotropie de fluorescence sont réalisées en utilisant un spectrofluorimètre SAFAS Flx-Xénius. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 495 nm, la longueur d'émission à 524 nm et la bande passante à 10 nm. Les constantes de dissociation des interactions sont déterminées par des expériences de titration réalisées dans le tampon A, par des étapes de dilution progressives d'une solution du partenaire non marqué en excès avec une solution contenant le ligand marqué (ETHE1-AF) à concentration fixe.

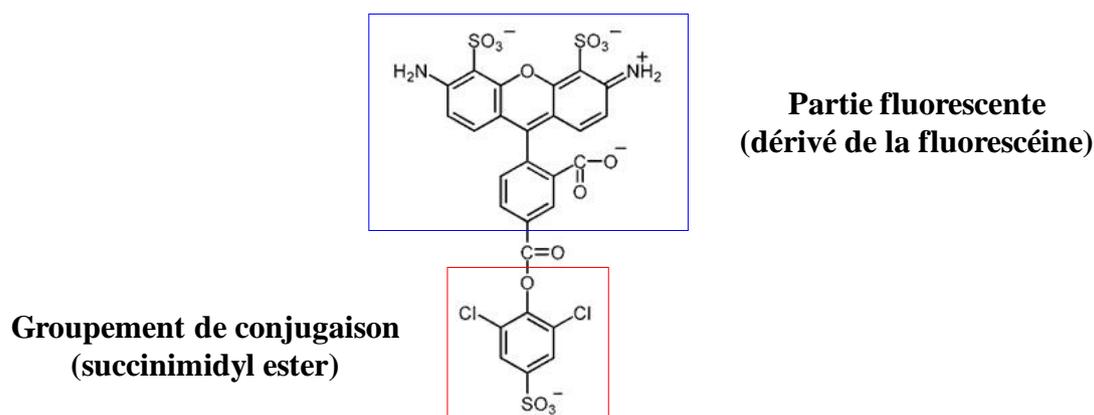


Figure 86. Sonde fluorescente Alexa Fluor 488 5-SDP ester (AF).

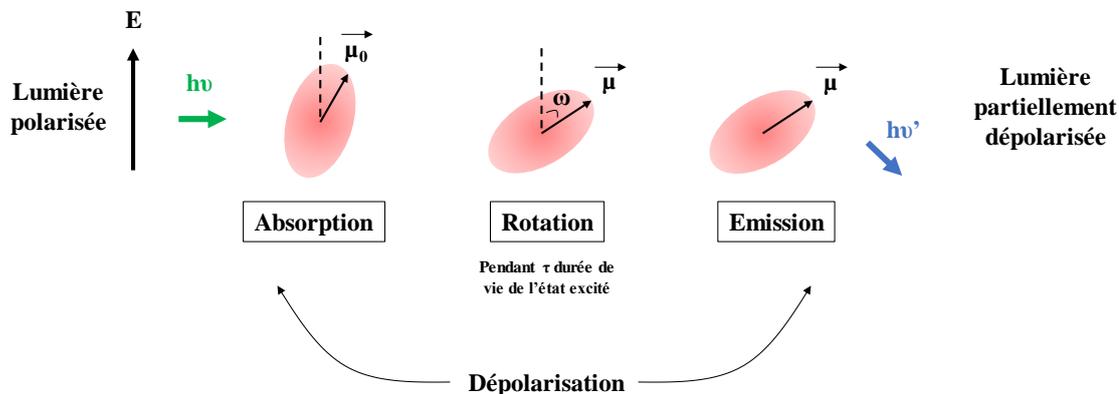
Le groupement de conjugaison (encadré rouge) et la partie fluorescente sont indiqués (encadré en bleu). La modification de la protéine a lieu sur des fonctions amines des chaînes latérales des résidus Lys ou de la fonction amine présente à l'extrémité N-terminale (favorisée à pH 8). La réaction de condensation conduit à la formation d'une fonction amide et à la libération du groupement de conjugaison.

La valeur d'anisotropie dépendant de la taille de la protéine marquée, la formation du complexe avec la protéine non marquée entraîne une augmentation de la taille et donc une augmentation de l'anisotropie.

L'utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour l'étude de complexes non-covalents repose sur le principe suivant : la polarisation du signal de fluorescence est sensible à l'état libre ou associé à un complexe du fluorophore. L'anisotropie de fluorescence mesure l'intensité relative de l'émission de fluorescence dans les directions parallèles et perpendiculaires à celles d'une source de lumière polarisée. Tout changement de direction des moments dipolaires de transition d'un fluorophore, pendant la durée de vie de l'état excité (principalement par diffusion et par rotation des fluorophores), entraîne une dépolarisation de la fluorescence et par conséquent une diminution de l'anisotropie de fluorescence (Figure 87). Une molécule de petite taille fluorescente, tournant rapidement dans le milieu, émettra de la lumière fortement dépolarisée. Le taux de polarisation et par conséquent l'anisotropie seront faibles. Par contre, si cette molécule fluorescente interagit avec une molécule de taille plus importante, le complexe

tournera moins rapidement, et la lumière restera polarisée. Le taux de polarisation et donc l'anisotropie seront élevés.

A



B

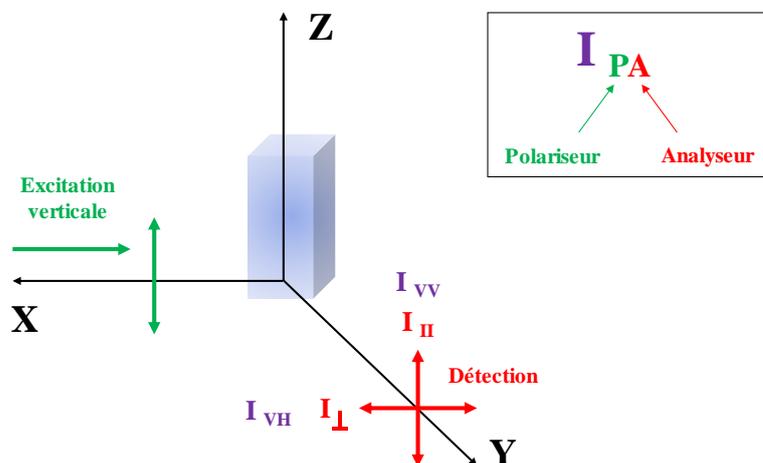


Figure 87. Principe physique de l'anisotropie de fluorescence.

A : L'anisotropie est une mesure de dépolariation de fluorescence, ainsi plus la valeur d'anisotropie est élevée plus la polarisation de la lumière incidente est conservée. Les molécules de petites tailles tournent rapidement et émettent de la lumière dépolariée alors que les plus grosses (notamment comme c'est le cas après la formation du complexe protéine/protéine) tournent lentement et par conséquent émettent de la lumière moins dépolariée.

B : Les intensités mesurées I_{VV} et I_{VH} sont identifiées par deux indices décrivant les orientations du polariseur d'excitation et l'analyseur, avec V : vertical et H : horizontal. La valeur d'anisotropie (r donnée par l'appareil est calculée selon l'Équation 17).

Le spectrofluorimètre permet de déterminer l'anisotropie (r) de l'échantillon excité par une sonde polarisée verticalement selon l'Équation 17. Avec I_{VV} l'intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation d'excitation et d'émission dans la position verticale, I_{VH} l'intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation d'émission dans la position horizontale, G le facteur qui représente le ratio de la sensibilité du détecteur pour la lumière polarisée verticalement et horizontalement, calculé à chaque mesure.

Matériels & Méthodes

$$r = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2G \times I_{VH}}$$

Équation 17. Equation utilisée par le logiciel du spectrofluorimètre permettant d'obtenir les valeurs d'anisotropie de fluorescence.

L'exploitation de cette différence d'anisotropie de fluorescence permet de déterminer la constante de dissociation du complexe (K_D) au cours d'expériences de titration. Les données obtenues sont exprimées selon la fraction de complexe formé calculée grâce à l'Équation 18.

$$F = \frac{A - Af}{Ab - Af}$$

Équation 18. Equation permettant la détermination de la fraction de complexe formé.

Et la valeur F est exprimée en fonction de la concentration en partenaire non marqué (TSTD1, Rhodanèse ou ^{h3}-MST). Cette titration est analysée selon un modèle simple d'interaction à un site correspondant à l'interaction d'une molécule d'ETHE1-AF avec un monomère de thioltransférase permettant de déterminer la constante de dissociation de l'interaction par l'utilisation de l'Équation 19 où F_{max} correspond à la fraction maximale de complexe formé, [TT] à la concentration en thioltransférase et K_D à la constante de dissociation.

$$F = \frac{F_{max} \times [TT]}{K_D + [TT]}$$

Équation 19. Equation d'ajustement hyperbolique utilisée pour le traitement des données d'anisotropie de fluorescence analysées selon un modèle d'interaction à un site.

*Références
bibliographiques*

- Abdolrasulnia, R., Wood, J.L., (1979). Transfer of persulfide sulfur from thiocystine to rhodanese. *Biochim. Biophys. Acta* **567**, 135–143.
- Abe, K., Kimura, H., (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 1066–1071.
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M., Tommassen, J., (2002a). PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Lett.* **518**, 173–176.
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M., Tommassen, J., (2002b). PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Lett.* **518**, 173–176.
- Agrò, A.F., Cannella, C., Graziani, M.T., Cavallini, D., (1971). A possible role for rhodanese: The formation of ‘labile’ sulfur from thiosulfate. *FEBS Lett.* **16**, 172–174.
- Aizenman, E., Lipton, S.A., Loring, R.H., (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* **2**, 1257–1263.
- Alphey, M.S., Williams, R.A.M., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Hunter, W.N., (2003). The crystal structure of *Leishmania major* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. A three-domain architecture with a serine protease-like triad at the active site. *J. Biol. Chem.* **278**, 48219–48227.
- Aminlari, M., Gilanpour, H., (1991). Comparative studies on the distribution of rhodanese in different tissues of domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* **99**, 673–677.
- Andersson, E., Westberg, H., Bryngelsson, I.-L., Magnuson, A., Persson, B., (2013). Cancer incidence among Swedish pulp and paper mill workers: a cohort study of sulphate and sulphite mills. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **86**, 529–540.
- Ang, A.D., Konigstorfer, A., Giles, G.I., Bhatia, M., (2012). Measuring free tissue sulfide. *Adv. Biol. Chem.* **02**, 360.
- Arden, N.K., Leyland, K.M., (2013). Osteoarthritis year 2013 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1409–1413.
- Augustyn, K.D.C., Jackson, M.R., Jorns, M.S., (2017). Use of Tissue Metabolite Analysis and Enzyme Kinetics To Discriminate between Alternate Pathways for Hydrogen Sulfide Metabolism. *Biochemistry* **2**, 1251–1253.
- Azumi, Y., Watanabe, A., (1991). Evidence for a Senescence-Associated Gene Induced by Darkness. *Plant Physiol.* **95**, 577–583.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Andjelkovich, D.A., (1984). A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 25–97.

Références bibliographiques

- Bełtowski, J., (2015). Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. *Pharmacol. Rep. PR* **67**, 647–658.
- Bhattacharjee, H., Sheng, J., Ajees, A., Mukhopadhyay, R., P Rosen, B., (2009). Adventitious Arsenate Reductase Activity of the Catalytic Domain of the Human Cdc25B and Cdc25C Phosphatases. *Biochemistry* **49**, 802–9.
- Bordo, D., Bork, P., (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* **3**, 741–746.
- Bordo, D., Deriu, D., Colnaghi, R., Carpen, A., Pagani, S., Bolognesi, M., (2000). The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol. Biol.* **298**, 691–704.
- Borowitz, J.L., Gunasekar, P.G., Isom, G.E., (1997). Hydrogen cyanide generation by mu-opiate receptor activation: possible neuromodulatory role of endogenous cyanide. *Brain Res.* **768**, 294–300.
- Bostelaar, T., Vitvitsky, V., Kumutima, J., Lewis, B.E., Yadav, P.K., Brunold, T.C., Filipovic, M., Lehnert, N., Stemmler, T.L., Banerjee, R., (2016). Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8476–8488.
- Brito, J.A., Sousa, F.L., Stelter, M., Bandejas, T.M., Vonrhein, C., Teixeira, M., Pereira, M.M., Archer, M., (2009). Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochemistry* **48**, 5613–5622.
- Bulmer, A.C., Ried, K., Blanchfield, J.T., Wagner, K.-H., (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat. Res.* **658**, 28–41.
- Burguera, E.F., Mejjide-Failde, R., Blanco, F.J., (2016). Hydrogen Sulfide and Inflammatory Joint Diseases. *Curr. Drug Targets.*
- Cagianut, B., Schnebli, H.P., Rhyner, K., Furrer, J., (1984). Decreased thiosulfate sulfur transferase (rhodanese) in Leber's hereditary optic atrophy. *Klin. Wochenschr.* **62**, 850–854.
- Cannella, C., Pecci, L., Finazzi Agro, A., Federici, G., Pensa, B., Cavallini, D., (1975). Selenium binding to beef-kidney rhodanese. *Eur. J. Biochem.* **55**, 285–289.
- Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., Möller, M.N., Folkes, L.K., García-Bereguiaín, M.A., Gutiérrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R., Alvarez, B., (2011). Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 196–205.

- Chattopadhyay, M., Kodela, R., Olson, K.R., Kashfi, K., (2012). NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid is a potent inhibitor of colon cancer cell growth in vitro and in a xenograft mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**, 523–528.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., Visca, P., (2007). Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* **59**, 51–59.
- Clemedson, C.J., Hultman, H.I., Sorbo, B., (1954). The antidote effect of some sulfur compounds and rhodanese in experimental cyanide poisoning. *Acta Physiol. Scand.* **32**, 245–251.
- Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., Szabo, C., (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9161–9166.
- Collman, J.P., Ghosh, S., Dey, A., Decréau, R.A., (2009). Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22090–22095.
- Colnaghi, R., Cassinelli, G., Drummond, M., Forlani, F., Pagani, S., (2001). Properties of the *Escherichia coli* rhodanese-like protein SseA: contribution of the active-site residue Ser240 to sulfur donor recognition. *FEBS Lett.* **500**, 153–156.
- Cornilescu, G., Vinarov, D.A., Tyler, E.M., Markley, J.L., Cornilescu, C.C., (2006). Solution structure of a single-domain thiosulfate sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**, 2836–2841.
- Cornish-Bowden, A., Cárdenas, M.L., (1987). Co-operativity in monomeric enzymes. *J. Theor. Biol.* **124**, 1–23.
- Cortese, M.S., Caplan, A.B., Crawford, R.L., (2002). Structural, functional, and evolutionary analysis of *moeZ*, a gene encoding an enzyme required for the synthesis of the *Pseudomonas* metabolite, pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid). *BMC Evol. Biol.* **2**, 8.
- Cortese-Krott, M.M., Kuhnle, G.G.C., Dyson, A., Fernandez, B.O., Grman, M., DuMond, J.F., Barrow, M.P., McLeod, G., Nakagawa, H., Ondrias, K., Nagy, P., King, S.B., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Singer, M., Kelm, M., Butler, A.R., Feelisch, M., (2015). Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4651-4660.
- Cortese-Krott, M.M., Pullmann, D., Feelisch, M., (2016). Nitrosopersulfide (SSNO⁻) targets the Keap-1/Nrf2 redox system. *Pharmacol. Res.* **113**, Part A, 490–499.

Références bibliographiques

- Crawhall, J.C., (1985). A review of the clinical presentation and laboratory findings in two uncommon hereditary disorders of sulfur amino acid metabolism, beta-mercaptolactate cysteine disulfideuria and sulfite oxidase deficiency. *Clin. Biochem.* **18**, 139–142.
- Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitiño, E.L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M.R., Alvarez, B., (2015). Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.* **290**, 26866–26880.
- Cuevasanta, E., Möller, M.N., Alvarez, B., (2016). Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Das, T.N., Huie, R.E., Neta, P., Padmaja, S., (1999). Reduction Potential of the Sulfhydryl Radical: Pulse Radiolysis and Laser Flash Photolysis Studies of the Formation and Reactions of $\cdot\text{SH}$ and $\text{HSSH}\cdot$ in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. A* **103**, 5221–5226.
- de Boer, T.N., Huisman, A.M., Polak, A.A., Niehoff, A.G., van Rinsum, A.C., Saris, D., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.J.P.G., Mastbergen, S.C., (2009). The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 482–488.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M., (1999). Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* **284**, 309–313.
- Di Meo, I., Fagiolari, G., Prella, A., Viscomi, C., Zeviani, M., Tiranti, V., (2011). Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 353–362.
- Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V., (2015). Mitochondrial diseases caused by toxic compound accumulation: from etiopathology to therapeutic approaches. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1257–1266.
- Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E., Roviezzo, F., Morelli, A., Cirino, G., Wallace, J.L., Fiorucci, S., (2006). Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 325–335.
- Drousiotou, A., DiMeo, I., Mineri, R., Georgiou, T., Stylianidou, G., Tiranti, V., (2011). Ethylmalonic encephalopathy: application of improved biochemical and molecular diagnostic approaches. *Clin. Genet.* **79**, 385–390.
- Edwards, J.O., Pearson, R.G., (1962). The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 16–24.

- El sahili, A., (2012). Etude du mécanisme d'une thioltransférase : la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase d'*Escherichia coli* – Rapport Master 2. Laboratoire AREMS UMR 7214 CNRS-UL.
- Everett, S.A., Wardman, P., (1995). Perthiols as antioxidants: radical-scavenging and prooxidative mechanisms. *Methods Enzymol.* **251**, 55–69.
- Fauman, E.B., Cogswell, J.P., Lovejoy, B., Rocque, W.J., Holmes, W., Montana, V.G., Piwnica-Worms, H., Rink, M.J., Saper, M.A., (1998). Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* **93**, 617–625.
- Ferdinand, W., (1966). The interpretation of non-hyperbolic rate curves for two-substrate enzymes. A possible mechanism for phosphofructokinase. *Biochem. J.* **98**, 278–283.
- Fiorucci, S., Distrutti, E., Cirino, G., Wallace, J.L., (2006). The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* **131**, 259–271.
- Forlani, F., Carpen, A., Pagani, S., (2003). Evidence that elongation of the catalytic loop of the *Azotobacter vinelandii* rhodanese changed selectivity from sulfur- to phosphate-containing substrates. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 515–519.
- Fox, B., Schantz, J.-T., Haigh, R., Wood, M.E., Moore, P.K., Viner, N., Spencer, J.P.E., Winyard, P.G., Whiteman, M., (2012). Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 896–910.
- Fräsdorf, B., Radon, C., Leimkühler, S., (2014). Characterization and interaction studies of two isoforms of the dual localized 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase TUM1 from humans. *J. Biol. Chem.* **289**, 34543–34556.
- Fu, M., Zhang, W., Wu, L., Yang, G., Li, H., Wang, R., (2012). Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2943–2948.
- Fukuto, J.M., Carrington, S.J., Tantillo, D.J., Harrison, J.G., Ignarro, L.J., Freeman, B.A., Chen, A., Wink, D.A., (2012). Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of Carbon, Dioxygen, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 769–793.
- Furne, J., Saeed, A., Levitt, M.D., (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1479-1485.
- Gibson, J.A., Sladen, G.E., Dawson, A.M., (1976). Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *Br. J. Nutr.* **35**, 61–65.

Références bibliographiques

- Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warenycia, M.W., Reiffenstein, R.J., Dowling, G., (1989). Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.* **13**, 105–109.
- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F., Bouillaud, F., (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 1699–1706.
- Green, J.R., Westley, J., (1961). Mechanism of rhodanese action: polarographic studies. *J. Biol. Chem.* **236**, 3047–3050.
- Greiner, R., Pálincás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., Dick, T.P., (2013). Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxid. Redox Signal* **20**, 1749–1765.
- Ha, C., Tian, S., Sun, K., Wang, D., Lv, J., Wang, Y., (2015). Hydrogen sulfide attenuates IL-1 β -induced inflammatory signaling and dysfunction of osteoarthritic chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 1657–1666.
- Hannestad, U., Mårtensson, J., Sjö Dahl, R., Sörbo, B., (1981). 3-mercaptolactate cysteine disulfiduria: biochemical studies on affected and unaffected members of a family. *Biochem. Med.* **26**, 106–114.
- Hayes, J.D., McMahon, M., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A.T., (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1713–1748.
- Henriques, B.J., Lucas, T.G., Rodrigues, J.V., Frederiksen, J.H., Teixeira, M.S., Tiranti, V., Bross, P., Gomes, C.M., (2014). Ethylmalonic encephalopathy ETHE1 R163W/R163Q mutations alter protein stability and redox properties of the iron centre. *PloS One* **9**, e107157.
- Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Nagao, T., Nonoguchi, K., Fujii, S., Itoh, K., Fujita, J., (2002). A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF-kappa B from the nucleus and inhibits p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **2**, 335–346.
- Hildebrandt, T.M., Grieshaber, M.K., (2008). Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* **275**, 3352–3361.
- Hofmann, K., Bucher, P., Kajava, A.V., (1998). A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J. Mol. Biol.* **282**, 195–208.

- Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H., (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 527–531.
- Hourihan, J.M., Kenna, J.G., Hayes, J.D., (2013). The gasotransmitter hydrogen sulfide induces nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 465–481.
- Huang, G.-T., Yu, J.-S.K., (2016). Enzyme Catalysis that Paves the Way for S-Sulphydration via Sulfur Atom Transfer. *J. Phys. Chem. B* **120**, 4608–4615.
- Huang, J., Niknahad, H., Khan, S., O'Brien, P.J., (1998). Hepatocyte-catalysed detoxification of cyanide by L- and D-cysteine. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1983–1990.
- Huang, Y., Tang, C., Du, J., Jin, H., (2015). Endogenous Sulfur Dioxide: A New Member of Gasotransmitter Family in the Cardiovascular System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, e8961951.
- Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N.O., Xian, M., Fukuto, J.M., Akaike, T., (2014). Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7606–7611.
- Jackson, M.R., Melideo, S.L., Jorns, M.S., (2012). Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry* **51**, 6804–6815.
- Jarabak, R., Westley, J., (1980). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase: rapid equilibrium-ordered mechanism with cyanide as the acceptor substrate. *Biochemistry* **19**, 900–904.
- Jencks, W.P., Carriuolo, J., (1960). Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1778–1786.
- Jung, M., Kasamatsu, S., Matsunaga, T., Akashi, S., Ono, K., Nishimura, A., Morita, M., Abdul Hamid, H., Fujii, S., Kitamura, H., Sawa, T., Ida, T., Motohashi, H., Akaike, T., (2016). Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **480**, 180–186.
- Kabil, O., Banerjee, R., (2012). Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H₂S catabolism. *J. Biol. Chem.* **287**, 44561–44567.
- Kabil, O., Banerjee, R., (2010a). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* **285**, 21903–21907.

Références bibliographiques

- Kabil, O., Banerjee, R., (2010b). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* **285**, 21903–21907.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663.
- Kashfi, K., (2014). Anti-Cancer Activity of New Designer Hydrogen Sulfide-Donating Hybrids. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 831–846.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89–116.
- Kimura, H., (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 619–621.
- Kimura, H., (2016). Hydrogen polysulfide (H₂S_n) signaling along with hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO). *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **123**, 1235–1245.
- Kimura, H., (2015a). Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **91**, 131–159.
- Kimura, H., (2015b). Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 362–376.
- Kimura, Y., Goto, Y.-I., Kimura, H., (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1–13.
- Kimura, Y., Kimura, H., (2004). Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1165–1167.
- Kimura, Y., Mikami, Y., Osumi, K., Tsugane, M., Oka, J., Kimura, H., (2013). Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 2451–2457.
- Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., Kimura, H., (2015). Identification of H₂S₃ and H₂S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Sci. Rep.* **5**, 14774.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M., (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–7139.

- Lagoutte, E., Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Blachier, F., Bouillaud, F., (2010). Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1500–1511.
- Landry, A.P., Ballou, D.P., Banerjee, R., (2017). H₂S oxidation by nanodisc-embedded human sulfide quinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **292**, 11641–11649.
- Leininger, K.R., Westley, J., (1968). The mechanism of the rhodanese-catalyzed thiosulfate-cyanide reaction. Thermodynamic and activation parameters. *J. Biol. Chem.* **243**, 1892–1899.
- Levitt, M.D., Abdel-Rehim, M.S., Furne, J., (2011). Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 373–378.
- Li, H., Yang, F., Kang, X., Xia, B., Jin, C., (2008). Solution Structures and Backbone Dynamics of Escherichia coli Rhodanese PspE in Its Sulfur-Free and Persulfide-Intermediate Forms: Implications for the Catalytic Mechanism of Rhodanese. *Biochemistry* **47**, 4377–4385.
- Li, X., Ellman, M., Muddasani, P., Wang, J.H.-C., Cs-Szabo, G., van Wijnen, A.J., Im, H.-J., (2009). PGE₂ And Its Cognate EP Receptors Control Human Adult Articular Cartilage Homeostasis and Are Linked to the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 513–523.
- Libiad, M., Yadav, P.K., Vitvitsky, V., Martinov, M., Banerjee, R., (2014). Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 30901–30910.
- Linden, D., Furne, J., Stoltz, G., Abdel-Rehim, M., Levitt, M., Szurszewski, J., (2012). Sulphide quinone reductase contributes to hydrogen sulphide metabolism in murine peripheral tissues but not in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2178–2190.
- Ling, S., Wang, W., Yu, L., Peng, J., Cai, X., Xiong, Y., Hayati, Z., Zhang, L., Zhang, Z., Song, L., Tian, C., (2016). Structure of an E. coli integral membrane sulfurtransferase and its structural transition upon SCN(-) binding defined by EPR-based hybrid method. *Sci. Rep.* **6**, 20025.
- Lippert, A.R., New, E.J., Chang, C.J., (2011). Reaction-based fluorescent probes for selective imaging of hydrogen sulfide in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10078–10080.
- MacLeod, A.K., McMahon, M., Plummer, S.M., Higgins, L.G., Penning, T.M., Igarashi, K., Hayes, J.D., (2009). Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* **30**, 1571–1580.

Références bibliographiques

- Matthies, A., Nimtz, M., Leimkühler, S., (2005). Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Humans: Identification of a Persulfide Group in the Rhodanese-like Domain of MOCS3 by Mass Spectrometry. *Biochemistry* **44**, 7912–7920.
- McCoy, J.G., Bingman, C.A., Bitto, E., Holdorf, M.M., Makaroff, C.A., Phillips, G.N., (2006). Structure of an ETHE1-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 964–970.
- Melideo, S.L., Jackson, M.R., Jorns, M.S., (2014). Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. *Biochemistry* **53**, 4739–4753.
- Mikami, Y., Kimura, H., (2012). A mechanism of retinal protection from light-induced degeneration by hydrogen sulfide. *Commun. Integr. Biol.* **5**, 169–171.
- Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Ogasawara, Y., Kimura, H., (2011). Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.* **439**, 479–485.
- Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Atanasiu, C., Benamouzig, R., Blouin, J.M., Tomé, D., Bouillaud, F., Blachier, F., (2012). Detoxification of H₂S by Differentiated Colonic Epithelial Cells: Implication of the Sulfide Oxidizing Unit and of the Cell Respiratory Capacity. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1–10.
- Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.-J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V., Hajitou, A., Smith, B., Vance, C., Shaw, C., Mazarakis, N.D., de Belleruche, J., (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7556–7561.
- Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., Szabo, C., (2013a). Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 601–611.
- Módis, K., Panopoulos, P., Coletta, C., Papapetropoulos, A., Szabo, C., (2013b). Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1311–1319.
- Moest, R.R., (1975). Hydrogen sulfide determination by the methylene blue method. *Anal. Chem.* **47**, 1204–1205.
- Möller, M.N., Lancaster, J.R., Denicola, A., (2008). Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. **61**, 23–42.

- Morton, N.M., Beltram, J., Carter, R.N., Michailidou, Z., Gorjanc, G., McFadden, C., Barrios-Llerena, M.E., Rodriguez-Cuenca, S., Gibbins, M.T.G., Aird, R.E., Moreno-Navarrete, J.M., Munger, S.C., Svenson, K.L., Gastaldello, A., Ramage, L., Naredo, G., Zeyda, M., Wang, Z.V., Howie, A.F., Saari, A., Sipilä, P., Stulnig, T.M., Gudnason, V., Kenyon, C.J., Seckl, J.R., Walker, B.R., Webster, S.P., Dunbar, D.R., Churchill, G.A., Vidal-Puig, A., Fernandez-Real, J.M., Emilsson, V., Horvat, S., (2016). Genetic identification of thiosulfate sulfurtransferase as an adipocyte-expressed antidiabetic target in mice selected for leanness. *Nat. Med.* **22**, 771–779.
- Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., (1998). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **7**, 1233–1244.
- Motl, N., Skiba, M.A., Kabil, O., Smith, J.L., Banerjee, R., (2017). Structural and biochemical analyses indicate that a bacterial persulfide dioxygenase-rhodanese fusion protein functions in sulfur assimilation. *J. Biol. Chem.* **292**, 14026–14038.
- Mueller, E.G., Palenchar, P.M., Buck, C.J., (2001). The role of the cysteine residues of ThiI in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J. Biol. Chem.* **276**, 33588–33595.
- Mulrooney, S.B., (1997). Application of a single-plasmid vector for mutagenesis and high-level expression of thioredoxin reductase and its use to examine flavin cofactor incorporation. *Protein Expr. Purif.* **9**, 372–378.
- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci. Signal.* **2**, ra72.
- Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., Nishino, T., (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 243–250.
- Nagahara, N., Li, Q., Sawada, N., (2003). Do antidotes for acute cyanide poisoning act on mercaptopyruvate sulfurtransferase to facilitate detoxification? *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **3**, 198–204.
- Nagahara, N., Nagano, M., Ito, T., Shimamura, K., Akimoto, T., Suzuki, H., (2013). Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci. Rep.* **3**, 1986.
- Nagahara, N., Nishino, T., (1996). Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. cDNA cloning, overexpression, and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 27395–27401.

Références bibliographiques

- Nandi, D.L., Westley, J., (1998). Reduced thioredoxin as a sulfur-acceptor substrate for rhodanese. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 973–977.
- Neta, P., Huie, R.E., (1985). Free-radical chemistry of sulfite. *Environ. Health Perspect.* **64**, 209–217.
- Nudler, E.A., Shatalin, K., (2012). Methods for treating infections by targeting microbial h2s-producing enzymes. WO2012106469 A3.
- Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S.-H., Kim, R., (2007). Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr. Purif.* **52**, 280–285.
- Ogasawara, Y., Ishii, K., Togawa, T., Tanabe, S., (1993). Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **215**, 73–81.
- Ogasawara, Y., Lacourciere, G., Stadtman, T.C., (2001). Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: Possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9494–9498.
- Olson, K.R., Donald, J.A., Dombkowski, R.A., Perry, S.F., (2012). Evolutionary and comparative aspects of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **184**, 117–129.
- Ono, K., Akaike, T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D.A., Tantillo, D.J., Hobbs, A.J., Nagy, P., Xian, M., Lin, J., Fukuto, J.M., (2014). The Redox Chemistry and Chemical Biology of H₂S, Hydropersulfides and Derived Species: Implications to Their Possible Biological Activity and Utility. *Free Radic. Biol. Med.* **0**, 82–94.
- Osmond, J.M., Kanagy, N.L., (2014). Modulation of hydrogen sulfide by vascular hypoxia. *Hypoxia.* **2**, 117–126.
- Ozsoy, O., Aras, S., Ozkan, A., Parlak, H., Aslan, M., Yargicoglu, P., Agar, A., (2016). The effect of ingested sulfite on visual evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant status of brain in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicol. Ind. Health* **32**, 1197–1207.
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R., Szabó, C., (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21972–21977.
- Park, S., Imlay, J.A., (2003). High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950.

- Patterson, S.E., Moeller, B., Nagasawa, H.T., Vince, R., Crankshaw, D.L., Briggs, J., Stutelberg, M.W., Vinnakota, C.V., Logue, B.A., (2016). Development of sulfanegen for mass cyanide casualties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1374**, 202–209.
- Patterson, S.E., Monteil, A.R., Cohen, J.F., Crankshaw, D.L., Vince, R., Nagasawa, H.T., (2013). Cyanide antidotes for mass casualties: water-soluble salts of the dithiane (sulfanegen) from 3-mercaptopyruvate for intramuscular administration. *J. Med. Chem.* **56**, 1346–1349.
- Pecci, L., Pensa, B., Costa, M., Cignini, P.L., Cannella, C., (1976). Reaction of rhodanese with dithiothreitol. *Biochim. Biophys. Acta* **445**, 104–111.
- Pettinati, I., Brem, J., McDonough, M.A., Schofield, C.J., (2015). Crystal structure of human persulfide dioxygenase: structural basis of ethylmalonic encephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2458–2469.
- Pickering, A.M., Linder, R.A., Zhang, H., Forman, H.J., Davies, K.J.A., (2012). Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 10021–10031.
- Picton, R., Eggo, M.C., Merrill, G.A., Langman, M.J.S., Singh, S., (2002). Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* **50**, 201–205.
- Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G., (1978). Structure of bovine liver rhodanese. I. Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *J. Mol. Biol.* **123**, 557–594.
- Rasheed, N., Alghasham, A., Rasheed, Z., (2016). Lactoferrin from *Camelus dromedarius* Inhibits Nuclear Transcription Factor-kappa B Activation, Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Stimulated Human Chondrocytes. *Pharmacogn. Res.* **8**, 135–141.
- Ray, W.K., Zeng, G., Potters, M.B., Mansuri, A.M., Larson, T.J., (2000). Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**, 2277–2284.
- Reja, S.I., Sharma, N., Gupta, M., Bajaj, P., Bhalla, V., Parihar, R.D., Ohri, P., Kaur, G., Kumar, M., (2017). A Highly Selective Fluorescent Probe for Detection of Hydrogen Sulfide in Living Systems: In Vitro and in Vivo Applications. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **23**, 9872–9878.
- Riahi, S., Rowley, C.N., (2014). Why can hydrogen sulfide permeate cell membranes? *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15111–15113.
- Ricard, J., Meunier, J.-C., Buc, J., (1974). Regulatory Behavior of Monomeric Enzymes. *Eur. J. Biochem.* **49**, 195–208.

Références bibliographiques

- Rickard, D., Luther, G.W., (2007). Chemistry of iron sulfides. *Chem. Rev.* **107**, 514–562.
- Robert, K., Vialard, F., Thiery, E., Toyama, K., Sinet, P.-M., Janel, N., London, J., (2003). Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **51**, 363–371.
- Rockwood, G.A., Thompson, D.E., Petrikovics, I., (2016). Dimethyl trisulfide: A novel cyanide countermeasure. *Toxicol. Ind. Health* **32**, 2009–2016.
- Roediger, W.E., Moore, J., Babidge, W., (1997). Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 1571–1579.
- Sattler, S.A., Wang, X., Lewis, K.M., DeHan, P.J., Park, C.-M., Xin, Y., Liu, H., Xian, M., Xun, L., Kang, C., (2015). Characterizations of Two Bacterial Persulfide Dioxygenases of the Metallo- β -lactamase Superfamily. *J. Biol. Chem.* **290**, 18914–18923.
- Savage, J.C., Gould, D.H., (1990). Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **526**, 540–545.
- Schumann, U., Subramani, S., (2008). Special delivery from mitochondria to peroxisomes. *Trends Cell Biol.* **18**, 253–256.
- Searcy, D.G., Lee, S.H., (1998). Sulfur reduction by human erythrocytes. *J. Exp. Zool.* **282**, 310–322.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., Nudler, E., (2011). H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* **334**, 986–990.
- Shen, X., Pattillo, C.B., Pardue, S., Bir, S.C., Wang, R., Kevil, C.G., (2011). Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1021–1031.
- Shen, X., Peter, E.A., Bir, S., Wang, R., Kevil, C.G., (2012). Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 2276–2283.
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., Kimura, H., (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* **4**, 1366.
- Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., Kimura, H., (2009a). Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J. Biochem. (Tokyo)* **146**, 623–626.

- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H., (2009b). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 703–714.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J., Khakh, B.S., (2013). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 10143–10153.
- Shih, V.E., Abroms, I.F., Johnson, J.L., Carney, M., Mandell, R., Robb, R.M., Cloherty, J.P., Rajagopalan, K.V., (1977). Sulfite oxidase deficiency. Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1022–1028.
- Smirnov, A., Comte, C., Mager-Heckel, A.-M., Addis, V., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N., Tarassov, I., (2010). Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **285**, 30792–30803.
- Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R.P., Tarassov, I., (2011). Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev.* **25**, 1289–1305.
- Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A.-M., Letzelter, M., Martin, R.P., Krasheninnikov, I.A., Entelis, N., (2008). Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* **14**, 749–759.
- Spallarossa, A., Donahue, J.L., Larson, T.J., Bolognesi, M., Bordo, D., (2001). Escherichia coli GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Struct. Lond. Engl.* 1993 **9**, 1117–1125.
- Spallarossa, A., Forlani, F., Carpen, A., Armirotti, A., Pagani, S., Bolognesi, M., Bordo, D., (2004). The “rhodanese” fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: crystal structure of SseA from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **335**, 583–593.
- Stein, G., G. Rao, S., Duron, S.G., Chapman, J., Sydserff S. G., (2016). Use of cse inhibitors for the treatment of cutaneous injuries or conditions and sleep-related breathing disorders. WO 2014018571 A2.
- Stipanuk, M.H., (1986). Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* **6**, 179–209.
- Stipanuk, M.H., Beck, P.W., (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* **206**, 267–277.

Références bibliographiques

- Stipanuk, M.H., Dominy, J.E., Lee, J.-I., Coloso, R.M., (2006). Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J. Nutr.* **136**, 1652S–1659S.
- Sun, Y.-G., Cao, Y.-X., Wang, W.-W., Ma, S.-F., Yao, T., Zhu, Y.-C., (2008). Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **79**, 632–641.
- Swaroop, M., Bradley, K., Ohura, T., Tahara, T., Roper, M.D., Rosenberg, L.E., Kraus, J.P., (1992). Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **267**, 11455–11461.
- Sylvester, D.M., Sander, C., (1990). Immunohistochemical localization of rhodanese. *Histochem. J.* **22**, 197–200.
- Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Módos, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., Hellmich, M.R., (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12474–12479.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V., (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**, 33–36.
- Teng, H., Wu, B., Zhao, K., Yang, G., Wu, L., Wang, R., (2013). Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12679–12684.
- Thomas, J.G., Baneyx, F., (1996). Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 11141–11147.
- Tiranti, V., D'Adamo, P., Briem, E., Ferrari, G., Mineri, R., Lamantea, E., Mandel, H., Balestri, P., Garcia-Silva, M.-T., Vollmer, B., Rinaldo, P., Hahn, S.H., Leonard, J., Rahman, S., Dionisi-Vici, C., Garavaglia, B., Gasparini, P., Zeviani, M., (2004). Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 239–252.
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M.D., Prelle, A., Fagioliari, G., Rimoldi, M., Zeviani, M., (2009). Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat. Med.* **15**, 200–205.
- Tiranti, V., Zeviani, M., (2013). Altered sulfide (H₂S) metabolism in ethylmalonic encephalopathy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011437.

- Toohey, J.I., (2012). The conversion of H₂S to sulfane sulfur. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 803–803.
- Vacek, T.P., Qipshidze, N., Tyagi, S.C., (2013). Hydrogen sulfide and sodium nitroprusside compete to activate/deactivate MMPs in bone tissue homogenates. *Vasc. Health Risk Manag.* **9**, 117–123.
- Vitvitsky, V., Yadav, P.K., Kurthen, A., Banerjee, R., (2015). Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J. Biol. Chem.* **290**, 8310–8320.
- Wallace, J.L., Wang, R., (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 329–345.
- Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., Deutsch, W.A., Lenardo, M.J., (2007). Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* **131**, 927–939.
- Wang, R., (2012). Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. *Physiol. Rev.* **92**, 791–896.
- Wang, R., (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 1792–1798.
- Warenycia, M.W., Goodwin, L.R., Benishin, C.G., Reiffenstein, R.J., Francom, D.M., Taylor, J.D., Dieken, F.P., (1989). Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 973–981.
- Wenzel, K., Felix, S.B., Flachmeier, C., Heere, P., Schulze, W., Grunewald, I., Pankow, H., Hewelt, A., Scherneck, S., Bauer, D., Hoehe, M.R., (2003). Identification and characterization of KAT, a novel gene preferentially expressed in several human cancer cell lines. *Biol. Chem.* **384**, 763–775.
- Westley, J., (1981). Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Methods Enzymol.* **77**, 285–291.
- Westley, J., Heyse, D., (1971). Mechanisms of sulfur transfer catalysis. Sulfhydryl-catalyzed transfer of thiosulfonate sulfur. *J. Biol. Chem.* **246**, 1468–1474.
- Westley, J., Nakamoto, T., (1962). Mechanism of rhodanese action: isotopic tracer studies. *J. Biol. Chem.* **237**, 547–549.

Références bibliographiques

- Westrop, G.D., Georg, I., Coombs, G.H., (2009). The mercaptopyruvate sulfurtransferase of *Trichomonas vaginalis* links cysteine catabolism to the production of thioredoxin persulfide. *J. Biol. Chem.* **284**, 33485–33494.
- Whitehouse, D.B., Poole, C.J., Kind, P.R., Hopkinson, D.A., (1989). Rhodanese isozymes in three subjects with Leber's optic neuropathy. *J. Med. Genet.* **26**, 113–115.
- Whitfield, N.L., Kreimier, E.L., Verdial, F.C., Skovgaard, N., Olson, K.R., (2008). Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1930-1937.
- Williams, R.A.M., Kelly, S.M., Mottram, J.C., Coombs, G.H., (2003). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase of *Leishmania* contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 1480–1486.
- Wolfe, M.D., Ahmed, F., Lacourciere, G.M., Lauhon, C.T., Stadtman, T.C., Larson, T.J., (2004). Functional diversity of the rhodanese homology domain: the *Escherichia coli* ybbB gene encodes a selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine synthase. *J. Biol. Chem.* **279**, 1801–1809.
- Yadav, P.K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M.R., Banerjee, R., (2016). Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 289–299.
- Yadav, P.K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., Banerjee, R., (2013). Structure and Kinetic Analysis of H₂S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* **288**, 20002–20013.
- Yamasaki, H., (2005). The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ.* **28**, 78–84.
- Yamasaki, H., Cohen, M.F., (2016). Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **55**, 91–100.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R., (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* **20**, 6008–6016.

Résumé

Les 3-mercaptopyruvate sulfurtransférases (3-MST) et les thiosulfate sulfurtransférases (TST) sont des enzymes ubiquitaires de la famille des thioltransférases à domaine rhodanèse qui catalysent le transfert d'un atome de soufre d'un substrat donneur vers un substrat accepteur *via* un intermédiaire Cys-persulfure. Les 3-MST sont impliquées dans la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S), un gazotransmetteur toxique à forte concentration, alors que les TST interviendraient dans son élimination. L'objectif de mon projet était de décrypter les mécanismes moléculaires impliquant ces thioltransférases afin de mieux comprendre leurs rôles physiologiques. Pour cela, le mécanisme catalytique et les spécificités de substrats des enzymes humaines (3-MST, TSTD1 et Rhodanèse) et d'*Escherichia coli* (3-MST et GlpE) ont été caractérisés grâce à la mise au point de méthodes spécifiques permettant l'étude de chacune des étapes du mécanisme (fluorescence, stopped-flow, sonde H₂S) et par une étude des relations structure-fonction menée en collaboration pour les aspects chimie théorique et cristallographie RX.

J'ai montré que le site actif de ces enzymes est adapté à la catalyse d'un transfert de S⁰ à partir de composés soufrés non activés. De plus, le mécanisme de formation de l'intermédiaire persulfure ne dépend pas de l'enzyme mais du substrat donneur. En effet, la rupture de la liaison C-S du 3-mercaptopyruvate requiert la déprotonation des fonctions thiols du substrat et de la Cys essentielle, fonction assurée par la boucle catalytique CysX₅ qui constitue un véritable site de reconnaissance thiolate, et l'intervention concomitante d'une molécule d'eau comme catalyseur acide. En présence de thiosulfate, hormis l'activation de la Cys seule la neutralisation des charges négatives du substrat est indispensable à la réaction de transfert de soufre. Enfin, et de façon inattendue, la 3-MST humaine pourrait être impliquée dans l'élimination cytosolique du sulfite, un composé toxique pour les cellules. Quant aux deux TST mitochondriales humaines, elles pourraient intervenir à la fois dans la signalisation cellulaire H₂S-dépendante, *via* la production d'espèces polysulfure, et dans l'élimination d'H₂S.

Mots clés	H₂S	Thioltransférases	Catalyse	Persulfure	Spécificités de substrats
------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------	-------------------	----------------------------------

Abstract

3-mercaptopyruvate sulfurtransferases (3-MSTs) and thiosulfate sulfurtransferases (TSTs) are ubiquitous enzymes that belong to the rhodanese sulfurtransferase family and catalyze the transfer of a sulfur atom from a donor to an acceptor substrate *via* a cysteine-persulfide intermediate. While 3-MSTs are involved in the biogenesis of hydrogen sulfide (H₂S), a gasotransmitter known to be toxic at high concentration, TSTs are likely responsible of its degradation. My project mainly focused on deciphering the sulfurtransferase-dependent molecular mechanisms to better define their physiological functions. To address these questions, their catalytic mechanisms and substrate specificities were investigated. This was achieved through the development of kinetic approaches (fluorescence, stopped-flow, H₂S specific probe) to study each step of the reaction catalyzed by human (3-MST, TSTD1 and Rhodanese) and *Escherichia coli* (3-MST, GlpE) enzymes and structure-function relationship studies performed in collaboration for the theoretical chemistry and the X-ray crystallography parts.

Here, I show that the active site of these enzymes is optimized to perform an efficient S⁰ transfer from non-activated sulfur compounds. Moreover, the mechanisms leading to formation of the persulfide intermediate do not depend on the enzyme but rather on the donor substrate. Indeed, the cleavage of the carbon-sulfur bond of 3-mercaptopyruvate critically depends on the CysX₅ catalytic loop acting as a thiolate hole to favor the deprotonation of the essential Cys and the substrate, and on a water-mediated protonation step. In the presence of thiosulfate, the Cys activation mode remains unchanged and the reaction of sulfur transfer is only driven by the neutralization of the negative charges of the substrate. In addition, we propose a new physiological function for the human 3-MST in the cytoplasmic elimination of sulfite, a toxic compound for the cells. Finally, the two human mitochondrial TSTs are likely to be involved in the H₂S-mediated cellular signaling, through the formation of polysulfide entities, but also in H₂S catabolism.

Keywords	H₂S	Sulfurtransferases	Catalysis	Persulfide	Substrate specificities
-----------------	-----------------------	---------------------------	------------------	-------------------	--------------------------------