



**HAL**  
open science

# Caractérisation du rôle de la frataxine dans la machinerie de biosynthèse des clusters FeS et développement d'un logiciel de prédiction des protéines FeS

Florent Colin

► **To cite this version:**

Florent Colin. Caractérisation du rôle de la frataxine dans la machinerie de biosynthèse des clusters FeS et développement d'un logiciel de prédiction des protéines FeS. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ113 . tel-01149893

**HAL Id: tel-01149893**

**<https://theses.hal.science/tel-01149893v1>**

Submitted on 7 May 2015

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire  
CNRS - INSERM - Université de Strasbourg**

**THÈSE** présentée par :

**Florent Colin**

soutenue le : **9 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie**

**Caractérisation du rôle de la frataxine dans  
la machinerie de biosynthèse des clusters  
FeS et  
Développement d'un logiciel de prédiction  
des protéines FeS**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme. Hélène PUCCIO**

Docteur, IGBMC, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr. Juan FONTECILLA-CAMPS**

**Mr. Nicolas ROUHIER**

Docteur, Institut de Biologie Structurale de Grenoble  
Professeur, Université Henry Poincaré de Nancy

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr. Bertrand SERAPHIN**

**Mme. Sandrine OLLAGNIER**

**Mr. Olivier POCH**

Docteur, IGBMC à Illkirch

Docteur, CEA à Grenoble

Docteur, IGBMC à Illkirch



# TABLE DES MATIERES

<b>Abréviations</b>	5
<b>Liste des figures</b>	7
<b>Liste des tableaux</b>	8
<b>Préambule</b>	9
<b>Introduction</b>	10
<b>I - La Biosynthèse des centres FeS</b>	10
<b>I.1. Introduction</b>	10
<b>I.2. Les clusters fer soufre</b>	11
<b>I.2.1 Le fer et le soufre</b>	11
<b>I.2.2 Les états électroniques des clusters</b>	11
<b>I.2.3 Les fonctions des clusters au sein de leurs protéines</b>	11
<b>I.3. La formation des clusters fer soufre</b>	12
<b>I.3.1. Principe chimique</b>	12
<b>I.3.2. Principe de biosynthèse des centres fer soufre</b>	13
<b>I.4. La machinerie ISC</b>	13
<b>I.4.1. Principe de base</b>	13
<b>I.4.2. L'opéron Isc bactérien</b>	14
<b>I.4.3. La biosynthèses des clusters FeS</b>	14
<b>A. La cystéine désulfurase : le donneur de soufre</b>	14
<i>A.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles</i>	14
<i>A.2. Localisation et voies de biosynthèses</i>	15
<i>A.3. Interacteurs essentiels</i>	16
<b>B. Isd11, partenaire chez les eucaryotes</b>	16
<b>C. La frataxine : le donneur de fer ?</b>	17
<b>D. La ferrédoxine : le donneur d'électrons ?</b>	17
<b>E. IscU : la protéine d'échafaudage</b>	18
<i>E.1. IscU et les clusters FeS</i>	18
<i>E.2. Les caractérisations d'IscU</i>	19
<i>E.3. Les interacteurs d'IscU</i>	20
<i>E.4. Le fer, le soufre et IscU</i>	21
<b>F. HscA/HscB : le transfert des clusters FeS</b>	22
<i>F.1. HscB : l'initiation du transfert des clusters FeS</i>	22
<i>F.2. HscA : le transfert des clusters FeS sur les apo-protéines</i>	23

F.3. HscA/HscB : aspect mécanistique du transfert	23
G. Les autres protéines de la machinerie ISC	24
H. Les complexes de biosynthèse des clusters FeS	24
I.5. Machinerie extramitochondriale	25
I.6. Maladies associées à des défauts de la machinerie ISC	25
<b>II - La frataxine</b>	<b>26</b>
II.1. Conservation, structure, localisation et maturation de la frataxine	26
II.1.1. Conservation et structure de la frataxine	26
II.1.2. Localisation et maturation de la frataxine	28
II.2. Interactions de la frataxine	29
II.2.1. Les protéines de la biosynthèse des centres FeS	29
A. La frataxine : membre du complexe de biosynthèse des FeS	29
B. La frataxine : interaction directe avec ISCU/Isu	29
C. Autres interactions (machinerie ISC)	30
II.2.2. Interaction de la frataxine avec le fer	32
A. Le fer et la frataxine mammifère	32
B. Le fer et la frataxine levure	32
C. Le fer et la frataxine bactérienne	33
II.2.3. Autres partenaires protéiques potentiels	33
A. La ferrochélatase	33
B. L'aconitase mitochondriale	33
C. Les protéines de la chaîne respiratoire	34
II.3. Rôle de la frataxine	34
II.3.1. Fonction dans la production de centres FeS	34
A. Observations <i>in vivo</i>	34
B. Observations <i>in vitro</i>	35
II.3.2. Fonction dans le stockage/transport du fer ?	36
A. Observations <i>in vivo</i>	36
B. Observations <i>in vitro</i>	37
II.3.3. Fonction dans la protection contre le stress oxydant ?	38
A. Observations <i>in vivo</i>	38
B. Observations <i>in vitro</i>	38
<b>III - L'Ataxie de Friedreich</b>	<b>39</b>
III.1. Epidémiologie	39
III.2. Signes cliniques	39
III.3. Aspects moléculaires	40
III.3.1. Structure et expression du gène <i>FXN</i>	40
III.3.2. Les mutations du gène <i>FXN</i>	40
III.4. Physiopathologie	41

<b>Résultats</b>	<b>42</b>
<hr/>	
<b>I - Le rôle de la frataxine au cours de la biosynthèse des clusters FeS</b>	<b>42</b>
I.1. Contexte de l'étude	42
I.2. Questions biologiques	42
I.3. Conclusions des résultats	42
<b>II - Recherche et identification de nouvelles protéines FeS mammifères</b>	<b>43</b>
II.1. Contexte de l'étude	43
II.2. Méthodologie et approche pour la prédiction de candidats	44
II.2.1. Approches expérimentales	44
II.2.2. Approches bioinformatiques	45
II.3. Méthodes et Résultats	47
II.3.1. Le programme PredISC, un logiciel de recherche des signatures FeS	47
A. Identification des protéines FeS connues et de leurs signatures	48
A.1. Création de la liste initiale des protéines FeS	48
A.2. Construction et classification qualitative des motifs	49
B. Construction des softsigns	51
C. Recherche et filtration des candidats, amélioration des Softsigns	53
C.1. Traitement des Softsigns et recherche des candidats	53
C.2. Systèmes de filtration et d'amélioration de la qualité du jeu de données	54
C.2.1. Le programme Fuzztofuzzy	54
C.2.2. Le « re-design » des softsigns	55
D. Analyse et filtration des domaines contenant les Softsigns	56
D.1. Le système d'analyse des domaines	56
D.2. Les systèmes additionnels de filtration	58
E. Etude des données	58
II.4. MOCS3 : un candidat d'intérêt	59
II.4.1. Introduction	59
II.4.2. MOCS3, un candidat d'intérêt	60
II.4.3. MOCS3, expériences préliminaires	62
A. Clonage et tests de purification	62
B. Quantification du fer	63
II.5. Conclusions et objectifs	64
<b>Discussion</b>	<b>66</b>
<hr/>	
<b>I - Préambule</b>	<b>66</b>
<b>II - Les interactions de la frataxine</b>	<b>66</b>
II.1. Interactions non-essentiels et oligomérisation de la frataxine	66
II.2. Interactions avec les partenaires de la biosynthèse des clusters FeS	67
II.3. Stœchiométrie des complexes ternaire et quaternaire	68
<b>III - Le ou les rôle(s) de la frataxine</b>	<b>69</b>

III.1. La frataxine comme donneur de fer	69
III.2. La frataxine comme régulateur de l'activité cystéine désulfurase	70
III.3. La frataxine comme régulateur de la formation des clusters FeS	70
III.4. La frataxine : un stabilisateur du complexe ternaire	71
III.5. La structuration d'ISCU au sein du complexe quaternaire	72
<b>IV - La biosynthèse des clusters FeS : questions en suspens</b>	<b>75</b>
IV.1. Le fer ou le soufre en premier ?	75
IV.2. Les complexes ternaire et quaternaire et leurs clusters FeS	75
IV.3. Asymétrie des complexes	76
IV.4. Origine des électrons	77
<b>V - Le logiciel PredISC et la recherche de protéines FeS</b>	<b>78</b>
V.1. Limites à la recherche de candidats par le logiciel PredISC	78
V.2. La poursuite des recherches bioinformatiques	79
V.3. Les recherches complémentaires en biologie	80
<b>Références bibliographiques</b>	<b>82</b>
<hr/>	
<b>Annexes</b>	<b>95</b>
<hr/>	
<b><u>Annexe 1</u> : Rôle cellulaire essentiel de la frataxine par l'intermédiaire d'une interaction avec le complexe NFS1/ISD11/ISCU</b>	<b>95</b>
I.1. Contexte de l'étude	95
I.2. Questions biologiques	95
I.3. Conclusions des résultats	95
<b><u>Annexe 2</u> : Références bibliographiques des tableaux 2,3 et4</b>	<b>96</b>

## Abréviations

---

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AF	Ataxie de Friedreich
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
CIA	<i>Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly</i>
Cos-1	<i>Fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue</i>
cPMP	<i>cyclic Pyranopterin MonoPhosphate</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
D.O.	Densité Optique
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia (Ganglions Dorsaux Rachidiens)</i>
DTT	DiThioThréitol
EBI	Institut Européen de Bioinformatique
EXAFS	<i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>
FeS	Fer-Soufre
GAA	Triplet de nucléotides « Guanine Adénine Adénine »
GST	Glutathion
HIS	Histidine
HMM	<i>Hidden Markov Models</i>
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-ThioGalactoPyranoside</i>
ISC	<i>Iron Sulfur Cluster(s)</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
MMDS	<i>Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome</i>
MOCO	<i>Molybdene COfactor</i>
MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
NAD(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NIF	<i>Nitrogen Fixation</i>
PFAM	Base de données contenant les familles de protéines (Wellcome Trust Sanger Institut)
PLP	Phosphate de Pyridoxal
PROSITE	Base de données des domaines et familles de protéines (ExPASy)
RLD	<i>Rhodanese-Like Domain</i>



RMN (NMR)	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE (EPR)	Résonance Paramagnétique Electronique
SAM	S-AdénosylMéthionine
SAXS	<i>Small angle X-Ray scattering</i>
SBD	<i>Substrate Binding Domain</i>
SH3	<i>SRC Homology 3 (domain)</i>
SRS	<i>Search and Retrieval System</i>
SUF	<i>Sulfur Utilization Factor</i>
WW	<i>Rsp5-domain</i>

## Liste des figures

---

### Introduction

Figure 1 : Structures et valences des clusters FeS

Figure 2 : Principe de base de la biosynthèse des clusters FeS

Figure 3 : Opéron ISC bactérien

Figure 4 : Structure d'IscS

Figure 5 : Modèle structural mammifère de NFS1

Figure 6 : Mécanisme de la désulfuration des cystéines

Figure 7 : Structure des complexes IscS/IscU

Figure 8 : Modèle mammifère du complexe NFS1/ISD11

Figure 9 : Fixation de la ferrédoxine sur IscS

Figure 10 : Représentations ribbon d'IscU procaryote

Figure 11 : Interaction en HscA et IscU

Figure 12 : Modèle (*in silico*) du complexe entre Isu (IscU levure) et Jac1 (HscB levure)

Figure 13 : Mécanisme de transpersulfuration

Figure 14 : Rôle de Jac1 (HscB) dans le transfert des clusters FeS

Figure 15 : Modèle proposé du mécanisme de transfert des clusters FeS chez la bactérie : dynamique d'HscA

Figure 16 : Modèle proposé du mécanisme de formation et de transfert des clusters [2Fe-2S] d'IscU vers une apo-protéine par HscA et HscB.

Figure 17 : Structure du complexe IscS/IscU/CyaY

Figure 18 : Modèle du complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN

Figure 19 : Machinerie CIA chez la levure

Figure 20 : Maladies associées à des défauts de la biosynthèse des clusters FeS

Figure 21 : Conservation de la frataxine au cours de l'évolution

Figure 22 : Structures de la frataxine

Figure 23 : Régions conservées de la frataxine

Figure 24 : Structure oligomérique de la frataxine

Figure 25 : Maturation de la frataxine

Figure 26 : Résidus de la frataxine impliqués dans l'interaction avec la cystéine désulfurase et la protéine d'échafaudage

Figure 27 : Résidus de la frataxine impliqués dans l'interaction avec le fer

Figure 28 : Rôles proposés pour la frataxine

Figure 29 : Rôle de la frataxine dans la machinerie ISC

Figure 30 : Comparaison des oligomères de frataxines et de ferritines

Figure 31 : Réaction de Fenton

Figure 32 : Structure du gène *FXN* humain

Figure 33 : Répartition des mutations sur la frataxine

Figure 34 : Physiopathologie associée à l'ataxie de Friedreich

## Résultats

Figure 35 : Localisation des protéines FeS mammifères

Figure 36 : Caractéristiques du domaine hydrophile du complexe I de la chaîne respiratoire

Figure 37 : Principe de fonctionnement du programme PredISC

Figure 38 : Répartition des candidats et motifs au sein des cinq groupes

Figure 39 : Longueur moyenne des motifs de coordination des clusters FeS chez les bactéries et les mammifères

Figure 40 : Filtres appliqués aux Softsigns ou aux domaines protéiques contenant les motifs potentiels de coordination des clusters FeS

Figure 41 : Alignements multiples et phylogénie des domaines contenant les Softsigns

Figure 42 : Résultats pour la recherche dans Swissprot\_Mammals

Figure 43 : Résultats détaillés de la recherche des motifs sur Swissprot\_Mammals

Figure 44 : Caractéristiques de MOCS3 humain

Figure 45 : Hypothèses de travail concernant la synthèse du cofacteur MOCO

Figure 46 : Structure schématique de MoeB chez *E. Coli* (PDB : 1JW9)

Figure 47 : Expression et solubilité de hMOCS3, hMoeB et hMoMoeB

Figure 48 : Quantification du Fer dans les fractions solubles et insolubles de MOCS3, MoeB et MoMoeB

## Discussion

Figure 49 : Modèle de la fixation de la frataxine sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU

Figure 50 : Proposition d'un modèle théorique du mécanisme de biosynthèse des clusters FeS par la machinerie ISC

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Protéines impliquées dans l'étape précoce de biosynthèse des clusters FeS

Tableau 2 : Caractéristiques des résidus de la frataxine humaine (FXN)

Tableau 3 : Caractéristiques des résidus de la frataxine levure (Yfh1)

Tableau 4 : Caractéristiques des résidus de la frataxine bactérienne (CyaY)

Tableau 5 : Liste initiale des protéines FeS mammifères classifiées

Tableau 6 : Description des clusters FeS et des motifs de coordination pour les groupes A à E

Tableau 7 : Liste de candidats d'intérêt extraite manuellement

Tableau 8 : Filtration des candidats par une approche perpendiculaire : la réactivité des cystéines

## Préambule

---

L'équipe d'Hélène Puccio concentre depuis longtemps ses efforts sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ataxie de Friedreich. L'étude du rôle de la frataxine, protéine dont le déficit induit cette maladie génétique, a été réalisée avec succès dans différents modèles cellulaires et murins. A l'époque où je suis arrivé dans le laboratoire, des travaux nettement plus *in vitro* portant sur le rôle de la frataxine au sein de la machinerie de biosynthèse des clusters fer-soufre (FeS) avaient d'ores et déjà été entrepris et ont été pour moi de véritables fils d'Ariane. Mes travaux ont donc naturellement découlés de ceux de mes illustres prédécesseurs. Parallèlement à cela, j'ai eu la possibilité de pouvoir entreprendre un projet en bioinformatique portant sur l'identification de nouvelles protéines FeS. En effet, l'implication primaire de la frataxine dans la biosynthèse des clusters FeS devenait alors de plus en plus évidente. Aussi la compréhension des effets de son déficit passait forcément par l'amélioration de nos connaissances concernant les protéines FeS.

Et c'est finalement bien pour cette raison que j'ai choisi de construire mon introduction en privilégiant avant tout les protéines FeS et leur machinerie de biosynthèse chez les mammifères. La seconde partie porte sur la frataxine, l'élément central de mes études. Enfin, je terminerai avec quelques mots sur l'ataxie de Friedreich, cette maladie au nom de laquelle beaucoup s'investissent très justement pour faire avancer les connaissances.

La partie résultats est organisée en deux parties très distinctes correspondant aux deux projets sur lesquels j'ai travaillé pendant ma thèse. Le premier porte sur la détermination du rôle de la frataxine au sein du complexe de biosynthèse des clusters FeS, et est présenté sous la forme d'une publication. Si l'optimisation des purifications et certaines analyses biophysiques ont été réalisées à l'IGBMC à Illkirch, la majeure partie des caractérisations ont été réalisées au CEA à Grenoble sous la direction de Sandrine Ollagnier-de-Choudens. La seconde partie présente le programme PredISC que j'ai développé avec la Plateforme de bioinformatique de Strasbourg et l'aide quelque peu inédite de mon père, Pierre Colin, dont les compétences dans le domaine m'ont été très précieuses. Au delà de l'aspect programmation que j'ai limité au strict minimum, je présenterai les résultats que le logiciel peut générer sur des données mammifères. J'ajouterai quelques mots sur MOCS3, une protéine candidate.

Dans la partie discussion, j'ai essayé de montrer comment nos résultats participent à l'amélioration de la compréhension du rôle de la frataxine. J'ai également proposé de nouvelles hypothèses qui, je l'espère, pourraient être utiles pour les travaux futurs. J'ai également ajouté en annexe une publication de Stéphane Schmucker à laquelle j'ai un peu contribué.



## Introduction

---

### I - La Biosynthèse des centres FeS

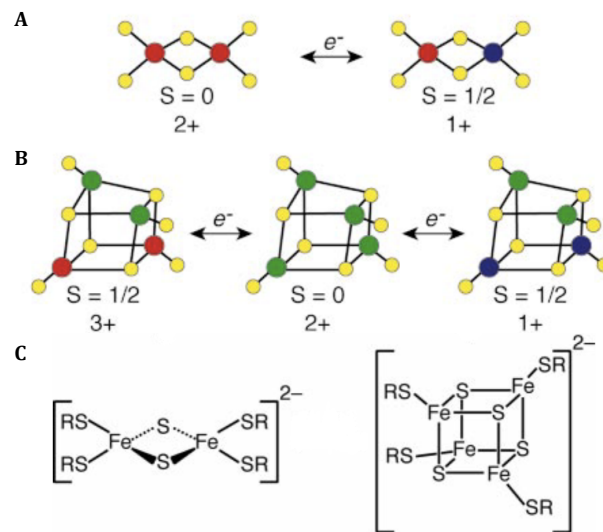
#### I.1. Introduction

Le développement soudain et rapide de la chimie bio-inorganique, et plus particulièrement du domaine des protéines fer-soufre (FeS) initié seulement dans les années 1960, a révolutionné notre vision du vivant (Beinert, 1997). En effet, aux côtés d'éléments fondamentaux de la vie, comme le carbone, l'hydrogène, l'azote, le soufre ou même l'oxygène, ont pris place de nombreux métaux, dont l'un des constituants principaux de notre planète : le fer. Si ces découvertes, plutôt récentes à l'échelle des sciences, ont pu montrer que les inventions faites par la nature depuis des milliards d'années sont d'une incroyable diversité, elles ont aussi pu questionner jusqu'aux origines de la vie.

Le mécanisme fondateur exact de l'apparition du vivant, voilà plus de 3.5 à 4 milliards d'années, reste aujourd'hui encore sujet à débat. L'hypothèse d'une origine sous-marine, à proximité des résurgences volcaniques, est l'une des plus communes. Quoi qu'il ait été réellement, si ce mécanisme fondateur a effectivement eu lieu dans des conditions aqueuses, anaérobiques et à hautes températures, il est fort probable que les éléments fer et soufre aient été de toute première importance par exemple pour l'activation initiale des acides aminés et leur assemblage sous forme de peptides (Huber and Wächtershäuser, 1998). De plus, la découverte de ces deux éléments sous forme de cofacteurs appelés clusters dans les sites actifs d'enzymes catalysant les transformations redox des molécules de diazote, de monoxyde de carbone et de dihydrogène, proposés comme composants de l'atmosphère primitive réductrice de notre planète, souligne également leurs caractères ancestraux (Rees and Howard, 2003).

Les caractéristiques des clusters FeS, notamment leur capacité unique à transférer des électrons, les ont rendus indispensables au développement de la vie. Leur importance est telle qu'ils ont résisté, voilà 2.5 milliards d'années, à l'oxygénation progressive de la planète par les organismes photosynthétiques (Imlay, 2006), devenant d'ailleurs cofacteurs essentiels du système de détoxification du dioxygène au niveau de la chaîne respiratoire. Aujourd'hui, nombre de fonctions essentielles sont assurées par des protéines FeS (Bandyopadhyay et al., 2008a; Lill and Mühlenhoff, 2008). Les systèmes de biosynthèse se sont développés et multipliés (Bandyopadhyay et al., 2008a; Lill, 2009; Lill and Mühlenhoff, 2006; Xu and Møller, 2011), et les clusters se sont diversifiés, incorporant de nouveaux métaux et arborant de nouvelles architectures complexes (Beinert, 1997, 2000; Rees, 2002).

La compréhension de ces mécanismes, science encore en devenir, permettra à terme d'expliquer comment des éléments aux caractéristiques fondatrices pour la vie arrivent à s'associer dans un milieu oxydant qui leur est *a priori* hostile, et ainsi former l'une des classes de groupes prosthétiques la plus diverse, ancienne et ubiquitaire : les clusters FeS.



**Figure 1: Structures et valences des clusters FeS**

Localisation des électrons sur les clusters (A) [2Fe-2S] et (B) [4Fe-4S]. En jaune les atomes de soufre, en rouge les atomes de Fe<sup>3+</sup>, en bleu les atomes Fe<sup>2+</sup>, en vert les paires Fe<sup>2.5+</sup>Fe<sup>2.5+</sup> (délocalisation d'un électron). Sont également indiqués, le spin (S) et le degré d'oxydation des clusters (*les clusters avec un spin nul n'ont aucun signal par RPE*). (C) Etat électronique des clusters [2Fe-2S]<sup>2+</sup> et [4Fe-4S]<sup>2+</sup> en considérant les ligands.  
 (Adaptée de Beinert, JBIC 2000)

## **1.2. Les clusters FeS**

### **1.2.1 Le fer et le soufre**

Les clusters FeS sont composés exclusivement d'atomes de fer et de soufre. L'importance de ces éléments, au delà de leur grande disponibilité sur Terre, tient principalement à leur polyvalence chimique, notamment celle du soufre. Celui-ci, observé dans la nature sous les valences  $S^{2-}$  à  $S^{6+}$ , est aussi prompt à être un électrophile, par exemple sous la forme de ponts disulfures, qu'un nucléophile dans le cas des thiols. Ainsi, le soufre peut former et casser des liaisons facilement, une dynamique qui lui est caractéristique (Beinert, 2000). Le fer est l'élément moins polyvalent puisqu'il n'est observé dans la nature que sous les formes  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$  (Beinert, 2000).

### **1.2.2 Les états électroniques des clusters**

Les clusters FeS existent sous deux formes principales, le rhombique  $[2Fe-2S]$  et le cubique  $[4Fe-4S]$ . Il en existe également d'autres plus rares comme le  $[3Fe-4S]$  et des formes plus complexes comme par exemple le  $[8Fe-8S]$  (Fontecave, 2006). Leur capacité à varier leurs degrés d'oxydation en perdant ou gagnant des électrons est leur caractéristique la plus inédite (Johnson et al., 2005). Les clusters rhombiques sont décrits sous les formes  $[2Fe-2S]^+$  à  $[2Fe-2S]^{2+}$  et les clusters cubiques sous les formes  $[4Fe-4S]^0$  à  $[4Fe-4S]^{3+}$  (Johnson et al., 2005) (Figure 1). Au sein des clusters, on considère que le fer a un degré d'oxydation de +2 à +3 (Beinert, 2000). Le soufre, atome nettement plus électronégatif, resterait ainsi sous l'état  $S^{2-}$ . Dans ce modèle, les degrés d'oxydation des atomes de fer et du cluster les contenant sont donc directement liés. Cependant, il a été montré que les clusters sont capables de délocaliser leurs densités électroniques sur le soufre mais également sur le fer (Johnson et al., 2005). D'autre part, le fer a également été décrit avec des valences mixtes, dont les valeurs se trouvent entre +2 et +3 (Beinert, 2000). Ceci montre qu'il existe une très grande dynamique électronique au sein des clusters FeS et que celle-ci dépend du contexte biochimique.

### **1.2.3 Les fonctions des clusters au sein de leurs protéines**

Les clusters FeS confèrent aux protéines qui les portent différentes fonctions biochimiques résultant, ou non, de leurs propriétés redox. Parmi les fonctions en dépendant directement, on retrouve la plus caractéristique d'entre-elles, le transport d'électrons et/ou de protons, que l'on peut classer en trois situations différentes. (1) Le transport mono-électronique dont c'est le rôle pour les nombreux clusters FeS des systèmes de photosynthèse et de respiration, mais également de ceux des ferrédoxines ( $[2Fe-2S]$ ,  $[3Fe-4S]$  et  $[4Fe-4S]$ ). (2) Le transport bi-électronique et protonique dans le cas très particulier de la nitrogénase ( $[8Fe-7S]$ ), une enzyme uniquement présente chez quelques organismes procaryotes. (3) La réduction des ponts disulfures comme par exemple dans le cas des ferrédoxines et





thiorédoxines réductases ([4Fe-4S]), dans les chloroplastes des plantes, par transfert successif de deux électrons (voir revue (Johnson et al., 2005)).

Mais l'importance redox des clusters leur permet d'être également d'excellents senseurs de l'état d'oxydation de la cellule. Ceci leur permet d'avoir un rôle important à deux niveaux. (1) La régulation de l'expression des gènes avec pour exemple SoxR (Demple et al., 2002) ([2Fe-2S]) et la FNR (Kiley and Beinert, 2003) ([4Fe-4S]) : l'oxydation de leurs clusters active directement leur fonction de régulateur transcriptionnel. Ces protéines ne sont retrouvées que chez des procaryotes. (2) La régulation de l'activité enzymatique dans le cas précis de la GPAT ([4Fe-4S]) où la maturation de la protéine par protéolyse est concomitante avec la dégradation de son cluster par le dioxygène.

La réactivité des clusters FeS leur permet d'avoir un rôle fonctionnel chez les enzymes dans deux cas. (1) La fixation et l'activation de substrat, phénomène observé par exemple dans le cas de l'aconitase (mitochondriale pour les eucaryotes), mais aussi pour l'ensemble des membres de la famille des radicales-SAM ([4Fe-4S]). (2) La fixation et le transfert de groupements thiométhyles, dans le cas précis de la biotin synthase (Berkovitch et al., 2004). Cette enzyme radicale-SAM possède un second cluster ([2Fe-2S]) qui est proposé comme plateforme pour le transfert de groupements  $\cdot S-CH_3$ . Cependant, cette fonction est vivement débattue, et l'hypothèse plus ancienne d'une dégradation du cluster pour fournir directement du soufre est plus communément citée.

Les possibilités offertes par les clusters FeS font qu'ils sont également utilisés pour des raisons complètement indépendantes de leurs propriétés redox ou de leur réactivité, et ceci dans trois cas bien distincts. (1) La structuration des protéines dans le cas des enzymes de la réparation de l'ADN : MutY et l'endonucléase3 ([4Fe-4S]) (Porello et al., 1998). Les clusters semblent y jouer des fonctions similaires au zinc des doigts de zinc en structurant une boucle essentielle pour la reconnaissance et la réparation de dommages à l'ADN. (2) Le stockage de fer ou de clusters FeS est observé notamment dans le cas des polyferrédoxines ([4Fe-4S]), présentes uniquement chez des archéobactéries et bactéries anaérobiques (voir revue (Johnson et al., 2005)). (3) La régulation de l'expression des gènes pour IRP1 ([4Fe-4S]) (Beinert et al., 1996). Dans le cas précis d'un déficit en fer dans la cellule, cette protéine clé dans l'homéostasie du fer va passer sous forme apo et se fixer sur ses ARNm cibles. Ainsi, en activant ou inhibant leur traduction, IRP1 promeut à la fois l'entrée du fer et limite son stockage.

### **1.3. La formation des clusters FeS**

#### **1.3.1. Principe chimique**

La formation chimique des clusters FeS a été largement étudiée. Ainsi, il a été montré *in vitro* que leur formation nécessite du fer ferreux, du sulfure, des thiolates d'alkyle ou d'aryle mimant les chaînes latérales des cystéines, ainsi que des conditions réductrices (Beinert, 1997). Ces quatre éléments sont indispensables et expliquent, au moins en partie, l'extrême



complexité que requiert la formation de ces cofacteurs *in vivo*. En effet le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{S}^{2-}$  sont deux espèces extrêmement réactives à pH physiologique : le fer ferreux réagit très rapidement avec l'oxygène par la réaction de Fenton ce qui produit des radicaux libres oxygénés, espèces très toxiques pour les cellules, ainsi que du  $\text{Fe}^{3+}$ . A ces mêmes pH, le sulfure n'est quant à lui pas une espèce stable et est très rapidement protoné pour former du  $\text{H}_2\text{S}$ . Ceci suggère donc que ces deux espèces doivent être associées rapidement et de manière coordonnée sur les groupements thiols des cystéines d'une protéine réceptrice. Ceci suppose également un mécanisme limitant la dégradation par l'oxygène et promouvant, si besoin, la réduction par des électrons. Un système de transfert aux protéines réceptrices est également nécessaire.

Précisons que le fer ferrique a été montré comme pouvant également permettre la formation de clusters FeS *in vitro*, au même titre que le fer ferreux (Frazzon, 2003). Même si sa solubilité est très limitée à pH physiologique (Curie and Briat, 2003), nous ne pouvons à ce jour exclure l'utilisation du  $\text{Fe}^{3+}$  pour la formation des clusters FeS *in vivo*.

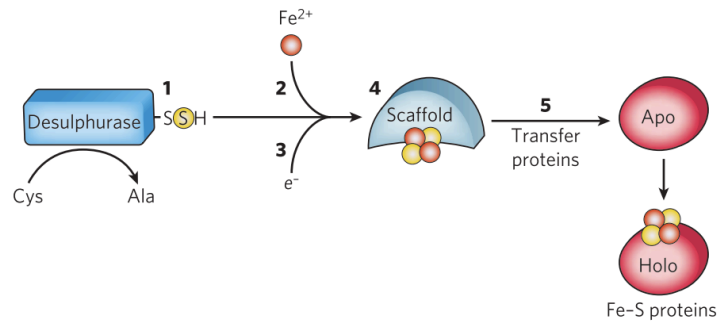
### **1.3.2. Principe de biosynthèse des centres FeS**

La fabrication des clusters FeS *in vivo* a été initialement caractérisée dans le système NIF (Nitrogen Fixation). Cette machinerie, décrite comme spécialisée dans la formation des clusters FeS nécessaires à l'enzyme Nitrogénase, n'est retrouvée que dans certaines familles de procaryotes communément appelés diazotrophes (voir revue (Raymond et al., 2004)). Cependant, quelques exceptions existent puisque la machinerie NIF est nécessaire et suffisante à la survie d'organismes ne possédant pas l'enzyme Nitrogénase comme *Helicobacter pylori* (Johnson et al., 2005). Deux machineries, décrites comme plus générales, furent identifiées par la suite : la machinerie ISC (Iron-Sulfur Cluster) et la machinerie SUF (Sulfur Utilization Factor) (Bandyopadhyay et al., 2008a; Frazzon, 2003). Ces deux machineries sont suffisantes et non-exclusives puisqu'elles sont retrouvées seules (ISC : *Azotobacter Vinelandii* ; SUF : *Thermatoga maritima*) ou ensemble (*Escherichia Coli*). Une quatrième machinerie CIA (Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly), retrouvée uniquement dans le cytosol des eucaryotes (Lill, 2009). Enfin, une pseudo machinerie CSD a également été mise à jour (Xu and Møller, 2011). L'identification de ces différentes machineries de biosynthèse des clusters FeS a permis d'en établir les étapes clés (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008). Nous nous attarderons ici sur la machinerie ISC puisque c'est celle dans laquelle est impliquée la frataxine.

## **1.4. La machinerie ISC**

### **1.4.1. Principe de base**

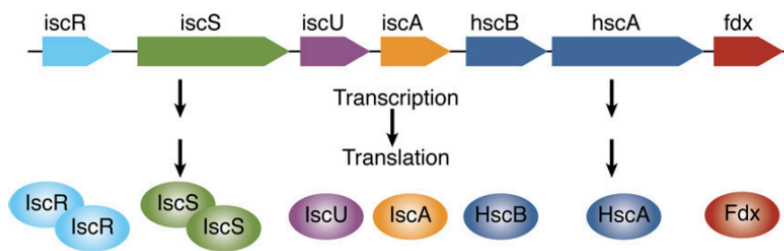
La biosynthèse des clusters FeS par la machinerie ISC est communément divisée en deux grandes étapes : la première est la biosynthèse des clusters FeS *de novo* sur une protéine



**Figure 2 : Principe de base de la biosynthèse des clusters FeS**

(1) Extraction de sulfure par l'activité cystéine désulfurase. (2) Arrivée du fer et (3) des électrons. (4) Formation d'un cluster FeS sur une protéine d'échafaudage. (5) Transfert vers une apo-protéine pour en faire une protéine FeS.

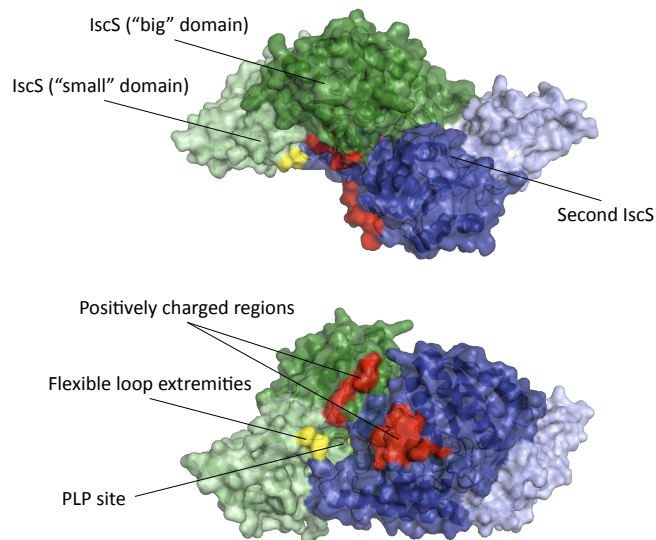
(Issue de Lill, Nature, 2009)



**Figure 3 : Opéron ISC bactérien**

**IscR** : protéine répresseur de l'expression de l'opéron. **IscS** : cystéine désulfurase. **IscU** : protéine d'échafaudage. **IscA** : rôle inconnu. **HscA et HscB** : chaperonne et co-chaperonne. **Fdx** : donneur d'électron.

(Issue de Markley, FEBS Letter, 2013)



**Figure 4 : Structure d'IscS**

Vues du dessus (haut) et de côté du dimère d'IscS (bas). En vert et bleu les deux IscS. Le "petit" domaine de chaque IscS est éclairci. En jaune les extrémités N- et C-terminales de la boucle flexible. En rouge, les régions contenant des résidus chargés positivement (PDB : 1P3W).

d'échafaudage, et la seconde consiste en son transfert à des protéines acceptrices (Figure 2) (Stehling and Lill, 2013). Cette schématisation de la biosynthèse, due à la caractérisation des différentes protéines comme ayant des rôles en amont ou en aval de la formations des clusters FeS sur la protéine d'échafaudage, peut prêter à confusion (Mühlenhoff et al., 2003). Si l'on veut être exact, la biosynthèse des clusters FeS à proprement parler se réduit à la première étape. La seconde étape correspondrait plutôt à une étape précoce de la maturation des protéines FeS. Ceci dit, il est important de considérer l'importante imbrication de ces deux étapes du point de vue mécanistique. Nous y reviendrons par la suite.

La synthèse des clusters FeS peut se réduire à quatre éléments clé à savoir (1) une source de soufre, (2) une source de fer, (3) une source d'électrons et enfin (4) un support sur lequel fabriquer les clusters FeS. Cependant, le contexte biologique implique l'intervention de nombreuses protéines. Nous allons donc ici discuter de l'ensemble de ces protéines impliquées dans la machinerie ISC, chez les procaryotes comme les eucaryotes, afin de comprendre quels sont leurs rôles. Dans un premier temps nous présenterons brièvement l'opéron ISC bactérien, puis nous décrirons les différentes étapes clés de la biosynthèse et les protéines qui y participent. Nous concluons enfin sur l'aspect transfert des clusters FeS, puis sur les différents modèles mécanistiques de la biosynthèse.

#### **1.4.2. L'opéron ISC bactérien**

La découverte de l'opéron ISC (Iron Sulfur Cluster) dans *A. vinelandii* puis plus tard dans la plupart des génomes bactériens (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008), a permis de poser les bases du fonctionnement de cette machinerie dont la compréhension ne cesse de s'affiner. Toutes les protéines nécessaires à la biosynthèse des clusters FeS y sont regroupées et sont nommément : IscR, IscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdx et IscX (Figure 3). L'ensemble de ces protéines existe également chez les mammifères, et plus généralement chez les eucaryotes, à l'exception d'IscR et d'IscX.

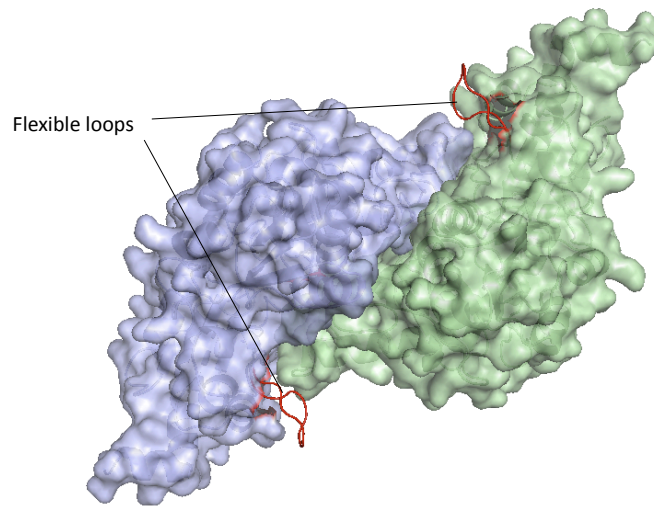
IscR est la première protéine codée par l'opéron ISC et est un régulateur transcriptionnel. Grâce à la présence, ou non, d'un cluster FeS dans la protéine, un mécanisme d'inhibition ou d'activation de la transcription de l'opéron va être observé (Bandyopadhyay et al., 2008a). Ce mécanisme est proche de celui réalisé par l'aconitase cytosolique, également grâce à un cluster FeS, mais vis-à-vis de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (Artymiuk and Green, 2006).

#### **1.4.3. La biosynthèses des clusters FeS**

##### **A. La cystéine désulfurase : le donneur de soufre**

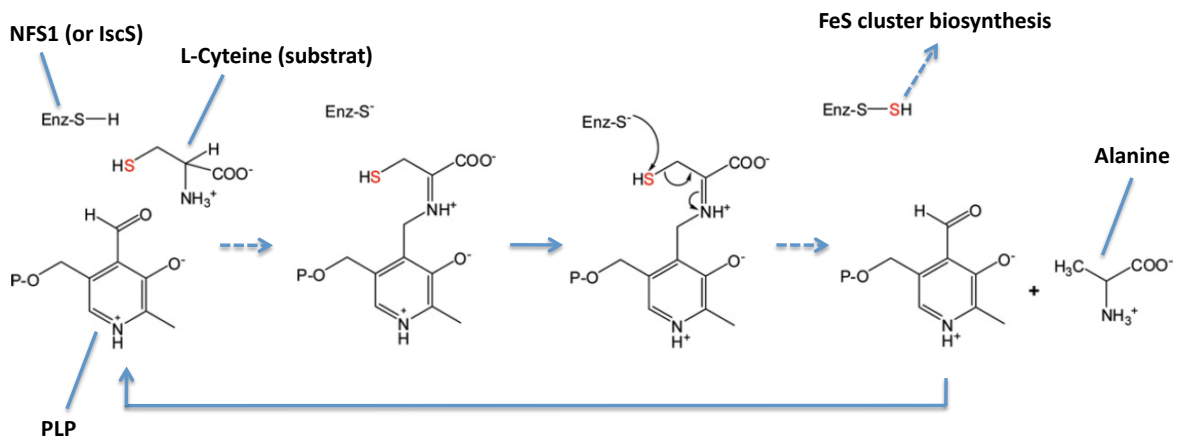
###### *A.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles*

IscS, et ses homologues eucaryotes Nfs1 (levure) et NFS1 (mammifère), appartiennent à la famille des enzymes dépendantes du cofacteur phosphate de pyridoxal (PLP) (Figure 4)



**Figure 5 : Modèle structural mammifère de NFS1.**

En bleu et vert, les deux NFS1. Les boucles flexibles contenant les cystéines catalytiques du dimère de NFS1 sont en rouge. Model produit grâce à SWISSMODEL



**Figure 6 : Mécanisme de la désulfuration des cystéines**

Le phosphate de pyridoxal (PLP) contenu dans le site actif de la cystéine désulfurase réagit avec la L-cystéine substrat pour former un intermédiaire. Cet intermédiaire est ensuite attaqué par la cystéine catalytique et permet la formation d'un persulfide et la libération d'alanine.

(Adaptée de Fontecave et al., 2008)

(Urbina et al., 2002). De la même manière que NifS (Kaiser et al., 2000), cette enzyme d'environ 45kDa se comporte *in vitro* comme un dimère. IscS est décrit comme stable et robuste chez la bactérie (Prischi et al., 2010a), ce qui n'est pas le cas de son orthologue mammifère (Canal et al., 2007; Schmucker et al., 2011). Chaque monomère d'IscS est composé de deux domaines structuraux : un petit (1-15 ; 264-404) qui comprend notamment la boucle contenant la cystéine essentielle d'IscS (Lauhon et al., 2004), et un grand (16-263) qui contient le site actif et la zone de dimérisation de l'enzyme (Urbina et al., 2002). Les deux sites actifs sont structurellement opposés et travailleraient plutôt de manière séquentielle que de manière coopérative (Urbina et al., 2002). La cystéine active d'IscS, située sur la boucle du petit domaine, est capable de s'approcher à moins de 3Å du PLP au sein du site actif et de s'en éloigner de plus de 17Å (Figure 5) (Cupp-Vickery, 2003), indiquant une grande flexibilité fonctionnelle.

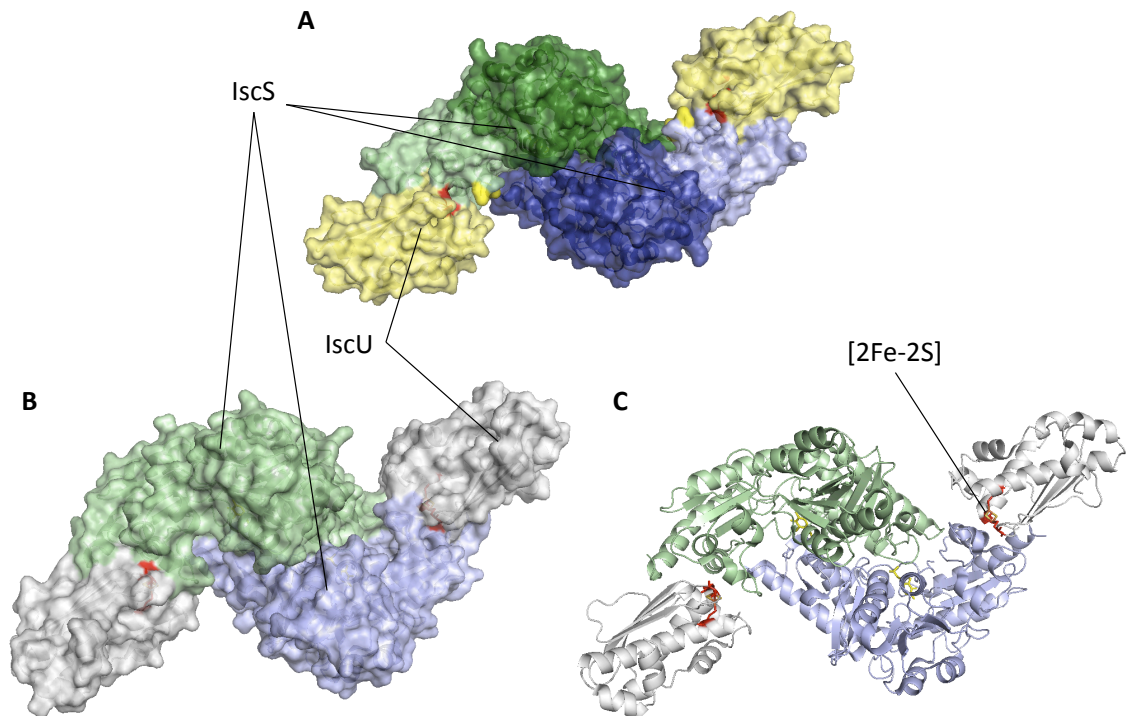
IscS est une cystéine désulfurase et est donc capable d'extraire le soufre de la chaîne latérale d'une « cystéine-substrat ». Ce mécanisme implique la fixation sur le PLP de la « cystéine-substrat » (grand domaine d'IscS) et l'attaque de sa chaîne latérale par la cystéine essentielle d'IscS, située sur la boucle flexible (petit domaine d'IscS). Ceci permet la formation d'un persulfure (-S-SH) sur la cystéine essentielle d'IscS, et son transfert vers des protéines réceptrices. La cystéine-substrat est libérée sous forme d'alanine (Figure 6) (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008).

#### A.2. Localisation et voies de biosynthèse

La cystéine désulfurase IscS a de très nombreux interacteurs et est impliquée dans de nombreuses voies de biosynthèse. Ainsi, IscS est impliqué dans la biosynthèse de clusters FeS (Schwartz et al., 2000), mais également de nombreux nucléosides thiolés (Kambampati and Lauhon, 1999, 2000; Lauhon, 2002; Nilsson et al., 2002), de la thiamine, du NAD (Lauhon, 2000) et de la sélénocystéine de la formate deshydrogénase H (Mihara et al., 2002). Il a également été montré comme capable de transférer du soufre sur le domaine Rhodanese de RhdA (Forlani et al., 2005) ou sur MoaD (Zhang et al., 2010). Ce nombre important de cibles implique de nombreuses interactions différentes et permet d'expliquer l'importance de la flexibilité de la boucle contenant la cystéine essentielle d'IscS (Shi et al., 2010).

Il est cependant important de noter que seul le rôle dans la biosynthèse des clusters FeS a été clairement caractérisé pour les différents homologues eucaryotes d'IscS (Nfs1 et NFS1) (Biederbick et al., 2006; Gerber et al., 2003; Tsai and Barondeau, 2010). Si nous ne pouvons exclure l'éventualité d'un rôle dans d'autres voies de biosynthèse, ceci donne aux homologues eucaryotes d'IscS une fonction nettement plus spécifique, conséquence éventuelle de leur localisation cellulaire. En effet, la plupart des études réalisées sur les cystéines désulfurases Nfs1/NFS1 chez les eucaryotes suggèrent non seulement la présence de séquence d'adressage mitochondriale mais confirment également leur localisation mitochondriale. Cette localisation est fonctionnellement essentielle (Biederbick et al., 2006;





**Figure 7 : Structure des complexes IscS/IscU**

(A) Structure IscS/IscU (*E. Coli* - 3LVL), en l'absence de clusters FeS. En jaune clair IscU sans cluster, en rouge les cystéines d'IscU, en jaune foncé l'extrémité de la boucle flexible. (B et C) Structure du complexe IscS/IscU (*A. Fulgidus* - 4EB5) en présence de clusters [2Fe-2S]. En gris IscU[2Fe-2S]. En rouge les cystéines d'IscU. Les deux IscS sont en vert et bleu.

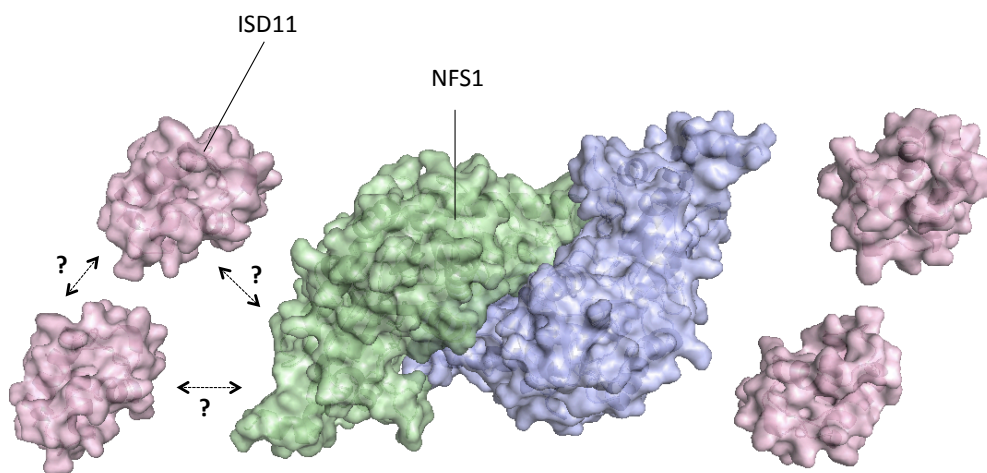
Nakai et al., 2001; Schmucker et al., 2011) et est nécessaire pour la maturation des protéines FeS extramitochondriales (Fosset et al., 2006). D'autres études suggèrent une localisation au moins partiellement cytosolique (Li et al., 2006; Marelja et al., 2008, 2013) avec une éventuelle fonction dans la biosynthèse du cofacteur Molybdène (MOCO), même si ces résultats restent controversés. Une localisation nucléaire (Naamati et al., 2009) a été également observée.

### A.3. Interacteurs essentiels

IscS, et ses différents orthologues, a un rôle essentiel dans la biosynthèse des clusters FeS. En effet IscS permet la formation de clusters sur IscU (Agar et al., 2000a) par un mécanisme de transfert du soufre sur les cystéines d'IscU, appelé transpersulfuration (Smith et al., 2001; Urbina et al., 2001). La formation transitoire de complexes covalents entre IscS et IscU au cours de ce mécanisme a rapidement suggéré une interaction directe entre ces deux partenaires (Kato et al., 2002; Smith et al., 2005). L'interaction entre IscS et IscU est désormais très bien caractérisée par cristallographie (Figure 7) (Marinoni et al., 2012; Shi et al., 2010) et révolutionne les hypothèses que les études de bioinformatiques avaient jusqu'alors proposées (Nuth and Cowan, 2009). En effet IscU n'interagit qu'avec le petit domaine d'IscS, à une distance significative du site actif mais à portée de la cystéine essentielle contenue dans la boucle flexible d'IscS (Shi et al., 2010). L'existence de cette interaction a également été confirmée chez les eucaryotes, même si aucune donnée structurale n'existe pour l'instant à l'exception de la stœchiométrie 1:1 entre la désulfurase NFS1 et la protéine d'échafaudage ISCU (Schmucker et al., 2011). Nous reviendrons plus en détails sur l'interaction IscS-IscU dans le chapitre consacré à IscU. Il en sera de même pour son interaction avec la frataxine et la ferrédoxine.

### B. Isd11, partenaire chez les eucaryotes

Isd11, également appelé LYRM4, est une petite protéine d'environ 11kDa dont la structure est inconnue. Cette protéine est systématiquement présente chez les eucaryotes (Richards and van der Giezen, 2006) et est mitochondriale (Shi et al., 2009). Très tôt, son rôle dans la biosynthèse des clusters FeS a été suggéré dans le modèle levure (Adam et al., 2006; Wiedemann et al., 2006). Si un rôle de stabilisateur de la cystéine désulfurase a initialement été proposé, car Isd11 limite l'agrégation de Nfs1 lors de sa purification *in vitro*, cette protéine est désormais considérée comme nécessaire pour l'activité même de Nfs1. En effet, le triple mutant d'Isd11 LYR>AAA chez la levure est capable de se fixer sur Nfs1, mais empêche toute activité cystéine désulfurase (Pandey et al., 2011). D'autre part, si la fixation de la « cystéine-substrat » sur le PLP ne semble pas affectée par Isd11, la formation d'un persulfure sur la cystéine essentielle de Nfs1 ne semble possible qu'en sa présence (Pandey et al., 2012). Isd11 pourrait donc avoir une influence directe ou indirecte sur la boucle flexible de Nfs1,



**Figure 8 : Modèle mammifère du complexe NFS1/ISD11**

La stœchiométrie du complexe NFS1/ISD11 suggère quatre ISD11 sur le dimère. Les zones d'interactions sont inconnues. Une structure purement théorique a été créée pour ISD11 par l'intermédiaire du logiciel SWISS-MODEL, elle ne donne donc qu'une idée de la taille relative d'ISD11 vis-à-vis de NFS1.

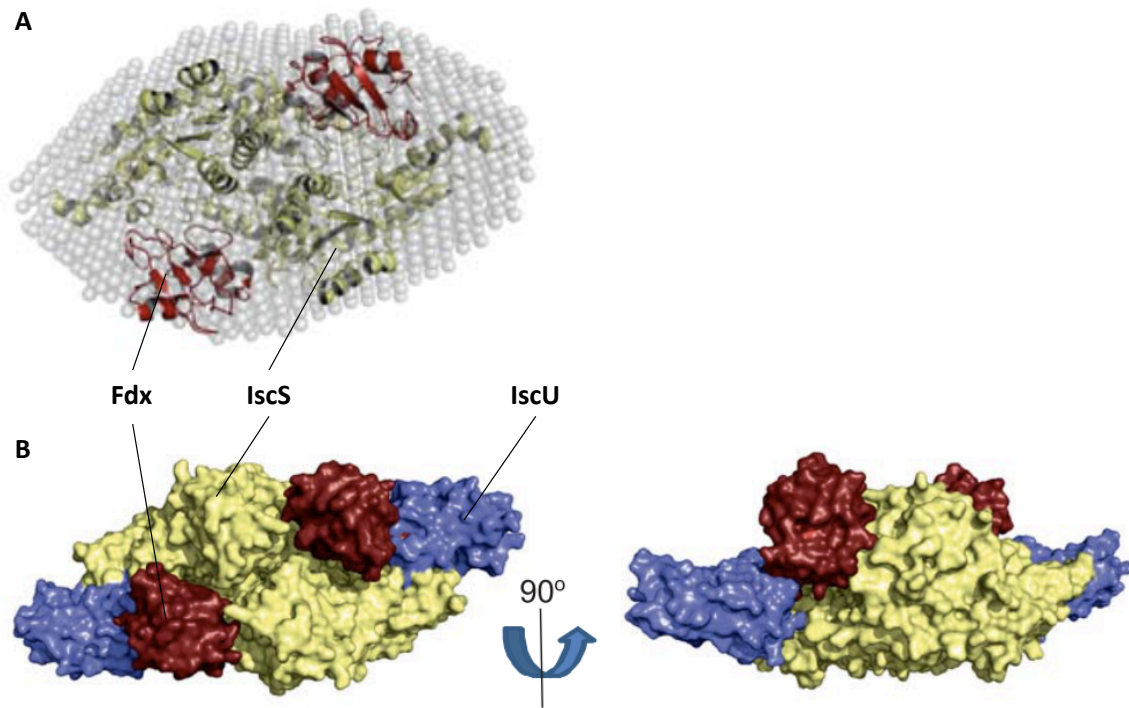
vraisemblablement par un effet structural. Des modélisations bioinformatiques ont permis de suggérer une structure pour Isd11 ainsi qu'une zone de fixation sur le petit domaine de Nfs1 dans un ratio 1:1, pour le modèle levure (Amela et al., 2013). Ce modèle est tout à fait séduisant pour deux raisons : premièrement, Isd11 interagit sur la seule région de Nfs1 non conservée avec IscS. Deuxièmement, l'interaction spécifique avec le petit domaine de Nfs1 expliquerait les observations faites sur la persulfuration de la cystéine essentielle puisque la boucle flexible est située sur ce domaine. Cependant nos propres études par spectrométrie de masse sur le modèle mammifère suggèrent la présence de deux ISD11 par NFS1 (Figure 8) (Colin et al., 2013; Schmucker et al., 2011). Parallèlement à cela, des travaux très préliminaires suggèrent qu'Isd11 pourrait également avoir un effet sur l'oligomérisation de Nfs1 (Terah et al., 2013).

### **C. La frataxine : le donneur de fer ?**

Comme précédemment énoncé, le fer ne peut pas se trouver sous forme ionique soluble dans le cytosol et la matrice mitochondriale, ni sous sa forme  $Fe^{2+}$ , ni sous sa forme  $Fe^{3+}$ . Actuellement, la frataxine est considérée comme le meilleur candidat comme donneur de fer puisque cette protéine possède deux zones de fixation du fer conservées au cours de l'évolution. Nous reviendrons cependant sur cet aspect dans le chapitre consacré à la frataxine.

### **D. La ferrédoxine : le donneur d'électrons ?**

L'identité du, ou des, donneur(s) d'électrons lors de la biosynthèse des clusters FeS reste inconnue. Cependant, la présence dans l'opéron ISC de la ferrédoxine a naturellement orienté la communauté scientifique vers cette protéine. En effet, celle-ci est capable d'échanger des électrons grâce aux propriétés oxydo-réductrices de son cluster  $[2Fe-2S]$  (Johnson et al., 2005). Elle est d'ailleurs la seule protéine de la machinerie ISC à être à la fois directement impliquée dans la biosynthèse des clusters FeS et à en posséder un elle-même. Cette protéine fonctionne de manière couplée avec une ferrédoxine réductase avec laquelle elle interagit (Kurisu et al., 2001) et dont le mécanisme de régénération est basée sur le NADPH. L'orthologue présent chez la levure s'appelle Yah1. Chez les mammifères deux homologues sont présents : l'adrénodoxine (ADX ou FDX1) et l'adrénodoxine-like ou ferrédoxine (ADXL ou FDX2). Deux études contradictoires suggèrent différentes fonctions pour chacune de ces deux protéines. Dans la première, l'adrénodoxine serait exclusivement impliquée dans la stéroïdogénèse ou la synthèse de la vitamine D alors que l'adrénodoxine-like serait plutôt impliquée dans la biosynthèse de l'hème et des clusters FeS (Sheftel et al., 2010). Dans la seconde, les deux paralogues seraient impliqués dans la biosynthèse des clusters FeS (Shi et al., 2012).



**Figure 9 : Fixation de la ferrédoxine sur IscS.**

(A) Docking du modèle IscS/Fdx sur les données obtenues par SAXS. (B) Modèle du complexe IscS/IscU/Fdx.  
*(Adaptée de Yan et al., 2013)*

Récemment, des études ont permis de démontrer une interaction entre la ferrédoxine bactérienne et le complexe IscS/IscU (cystéine désulfurase/protéine d'échafaudage) (Figure 9). De plus, il apparaît qu'il existe une compétition stérique entre la frataxine et la ferrédoxine pour le domaine de fixation (Kim et al., 2013; Yan et al., 2013). Ces observations, qui avaient déjà été faites avec le système mammifère (Stéphane Schmucker, données non publiées), confirment donc structurellement l'implication de la ferrédoxine dans la biosynthèse des clusters FeS à une étape précoce.

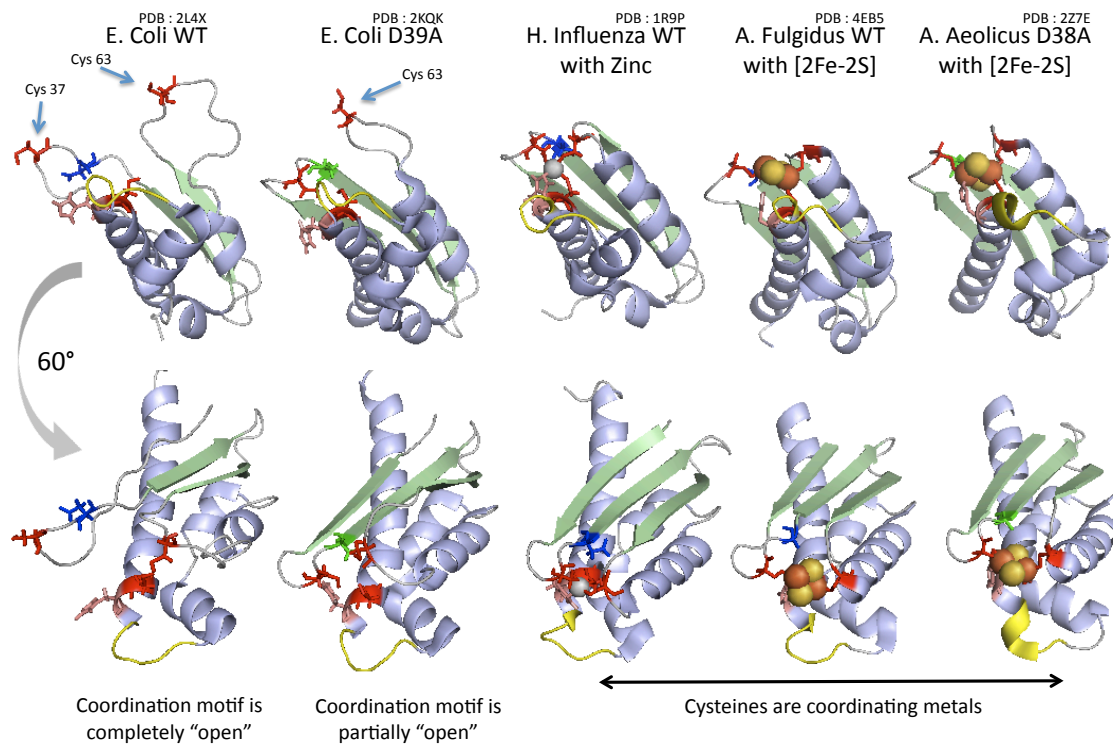
Cependant, afin de bien comprendre quel peut être le rôle de la ferrédoxine, il est important de comprendre à quels moments sont nécessaires les électrons. Lors de l'étape de biosynthèse des clusters FeS, des électrons sont nécessaires à deux moments : (1) lors de la réduction des persulfures et (2) lors de la conversion des clusters  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  en  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008). L'étape (1) nécessiterait formellement quatre électrons, mais l'oxydation de deux  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  permettrait de n'avoir besoin que de deux électrons, ceci dans l'hypothèse d'un mécanisme concerté pour la formation d'un cluster  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008). L'étape (2) nécessiterait deux électrons afin de réduire deux  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  en deux  $[2\text{Fe-2S}]^+$  et ainsi former un  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (Beinert, 1997; Walters et al., 2005). Il est important de remarquer que si aucune expérience n'a permis de montrer précisément que la ferrédoxine est capable de réaliser cette première étape, une récente étude a mis en évidence une oxydation du cluster de la ferrédoxine en présence du complexe IscS/IscU, de  $\text{Fe}^{2+}$  et de L-cystéine (Kim et al., 2013). Cette démonstration, bien qu'indirecte, est la première qui permet d'imaginer un rôle de la ferrédoxine à un moment aussi précoce, c'est-à-dire avant même la formation initiale d'un cluster  $[2\text{Fe-2S}]$ , alors que de nombreux efforts étaient jusqu'alors restés vains (Bandyopadhyay et al., 2008a). Précédemment, la ferrédoxine avait d'ores et déjà été démontrée comme étant capable de réduire deux clusters  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  afin de réaliser leur fusion en un cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (Chandramouli et al., 2007). Cette hypothèse était séduisante dans la mesure où elle permettait d'expliquer comment une protéine FeS pouvait participer à la biosynthèse de son propre cofacteur sans que cela ne pose de problème.

Quoi qu'il en soit, de nombreux efforts doivent encore être faits pour compléter la caractérisation du rôle de la ferrédoxine. L'implication d'autres réducteurs physiologiques et non protéiques est également tout à fait envisageable, puisque le glutathion réduit est parfaitement capable de réduire des persulfures sur NFS1 (données préliminaires).

## **E. IscU : la protéine d'échafaudage**

### *E.1. IscU et les clusters FeS*

Comme indiqué dans le précédent chapitre, les clusters FeS ne peuvent pas exister sous forme non-coordinée. Même dans le cas de la synthèse chimique de clusters synthétiques, la présence de thiolates d'alcyloxy ou d'aryloxy ( $\text{R-S}^-$ ) mimant les résidus cystéines est nécessaire. D'ailleurs, les clusters  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  ou  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  sont respectivement décrits comme



**Figure 10 : Représentations ribbon d'IscU procaryote**

Représentation d'IscU procaryote sous forme apo (*E. Coli*, 2L4X), mutée D39A (*E. Coli*, 2KQK), en présence de zinc (*H. Influenza*, 1R9P) ou d'un cluster 2Fe-2S (*A. Fulgidus* 4EB5 et *A. Aeolicus* D38A 2Z7E). Les feuilletts sont représentés en vert, les hélices en bleu. Les cystéines impliquées dans la coordination sont indiquées en rouge, les équivalents de l'aspartate 39 en bleu foncé. Le fragment LPPVK reconnu par la chaperonnes HscA est représenté en jaune. Le zinc est en gris métalisé, le cluster FeS en ocre et or.

$[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4]^{2-}$  ou  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{2-}$  par Helmut Beinert (Beinert, 1997) ce qui représente peut-être plus justement la richesse électronique des clusters et leur fixation covalente sur les espèces coordinantes (Bill, 2011).

Dans la machinerie ISC, IscU est cette protéine d'échafaudage. L'homologue levure d'IscU est Isu. Chez l'humain, le gène codant pour la protéine ISCU peut être sujet à un épissage alternatif (Rouault, 2000). Ainsi deux formes, ISCU1 minoritaire et cytosolique, et ISCU2 majoritaire et mitochondriale, sont décrites dans la littérature (Crooks et al., 2012). L'importance fonctionnelle d'ISCU1 étant sujet à débat et ISCU2 étant le seul isoforme capable d'avoir une action sur la biosynthèse des clusters FeS de part sa localisation cellulaire, ISCU2 sera nommé ISCU pour la suite du manuscrit.

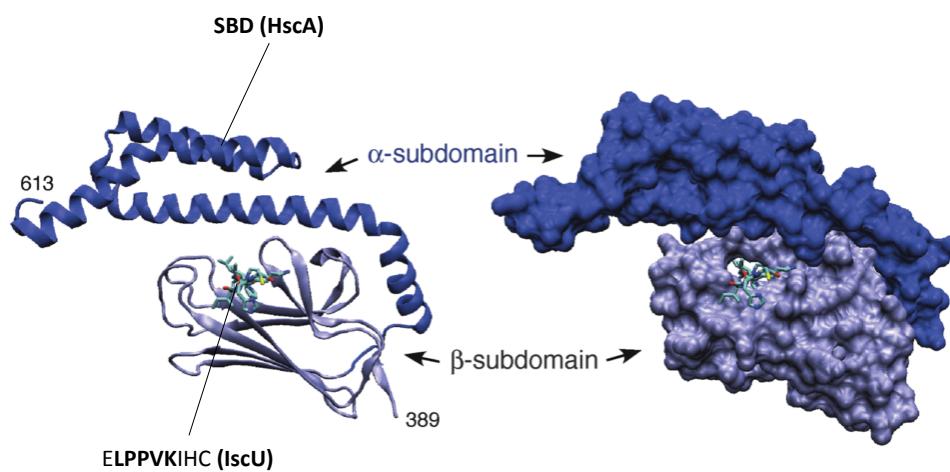
Les différents homologues de la protéine ISCU possèdent un motif de coordination des clusters FeS composé de trois cystéines. Même si la présence d'une quatrième cystéine chez les mammifères est avérée, aucune démonstration de son implication dans la biosynthèse des clusters FeS n'a été faite à ce jour. De nombreuses études, principalement sur l'homologue bactérien, ont été réalisées afin de comprendre sa nature, son rôle et d'identifier ses interacteurs.

### *E.2. Les caractérisations d'IscU*

Les différentes caractérisations structurales d'IscU, notamment par RMN, ont permis de suggérer que cette protéine existe sous deux formes monomériques : une forme ordonnée et une seconde désordonnée (Markley et al., 2013), toutes deux solubles et inter-convertibles. L'existence de plusieurs isoformes d'IscU avait déjà été proposée auparavant (Mansy et al., 2004), mais a toujours fait l'objet d'un débat puisque l'hypothèse d'une précipitation partielle avait également été émise (Adinolfi et al., 2004a), surtout en l'absence d'un partenaire (Prischi et al., 2010a). Cependant, il semble que cette souplesse structurale soit fonctionnellement importante pour son interaction avec les différents partenaires de la biosynthèse des clusters FeS (Markley et al., 2013), et soit également conservée chez les mammifères (Cai et al., 2013). Nous y reviendrons ci-après. Il est important de noter que la présence de zinc ou de certaines mutations, comme la mutation D39A, a d'importantes conséquences sur l'équilibre entre ces deux isoformes, puisqu'elles favorisent l'état ordonné (Figure 10) (Kim et al., 2011, 2012a).

Avant de poursuivre avec les interacteurs spécifiques d'IscU, il me semble important de rappeler qu'IscU a également été proposé comme étant capable de multimériser, sous une forme dimérique (1) et une forme trimérique (2). S'agissant de la première (1), elle a été proposée en présence de ponts disulfures (Kato et al., 2002), d'un ou deux clusters  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  ou d'un cluster  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  (Agar et al., 2000b; Mansy et al., 2002). Malgré de très nombreuses études, y compris relativement récentes, sur le mécanisme de coordination des clusters par les homodimères d'IscU (Bonomi et al., 2011), il est très surprenant de constater qu'il n'existe aucune démonstration par spectrométrie de masse ou toutes autres approches





**Figure 11 : Interaction entre HscA et IscU**

Représentation ribbon et surface du domaine SBD (Substrate Binding Domain) d'HscA en interaction avec le motif ELPPVKIHC d'IscU.

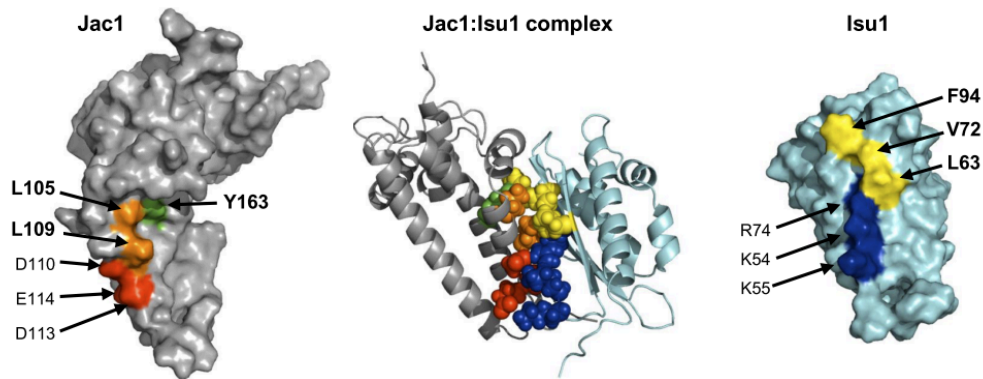
*(Issue de Vickery et al., 2007)*

spectroscopiques ou structurales, permettant d'établir l'existence réelle de cette espèce. Au contraire, celles-ci établissent systématiquement l'existence d'une forme monomérique (Adinolfi et al., 2004a; Liu et al., 2005; Ramelot et al., 2004; Smith et al., 2001, 2005). Si des démonstrations indirectes permettent de suggérer l'existence de cette espèce, par gel-filtration ou dynamic-light scattering (Mansy et al., 2004; Ramelot et al., 2004), il est saisissant de constater que les analyses par RMN de ces espèces révèlent plutôt l'existence d'une forme trimérique (2) (Shimomura et al., 2007, 2008). Bien que cette forme trimérique, ainsi que l'existence d'un dimère d'IscU et d'un mécanisme séquentiel de formation des [4Fe4S] soient séduisants (Agar et al., 2000b; Chandramouli et al., 2007), d'autres approches remettent fondamentalement en question ces concepts, avec en premier lieu la nature de l'interaction de IscU avec d'autres partenaires, notamment IscS.

### *E.3. Les interacteurs d'IscU*

IscU est capable d'interagir avec plusieurs autres protéines de la biosynthèse des clusters FeS : (1) la cystéine désulfurase IscS, (2) la chaperonne HscA, sa (3) co-chaperonne HscB et (4) la frataxine. L'existence d'une interaction entre la protéine d'échafaudage IscU et la cystéine désulfurase IscS (1) a été proposée très tôt (Agar et al., 2000b) et fonctionnellement confirmée (Raulfs et al., 2008). L'hypothèse d'une structure en  $\alpha 2\beta 2$ , a été validée par cristallographie chez la bactérie (Marinoni et al., 2012; Shi et al., 2010) ainsi que par spectrométrie de masse chez les mammifères (Colin et al., 2013; Schmucker et al., 2011). Il semble donc que deux IscU, sous forme monomérique, se fixent sur un dimère d'IscS. Ceci est un constat fondamental qui est d'autant plus important que l'incubation d'IscU avec IscS à un ratio 1:1 conduit à la formation du complexe IscU/IscS et permet la reconstitution de clusters [4Fe-4S] (Agar et al., 2000b). Ceci est d'ailleurs également le cas chez les mammifères (Colin et al., 2013). Si cela ne remet pas en cause un mécanisme d'association de deux [2Fe-2S] pour faire un [4Fe-4S], ceci suggère clairement que la forme dimérique d'IscU n'est pas fonctionnellement indispensable pour cela. Ceci n'exclut pas qu'elle puisse être nécessaire à une étape ultérieure, lors du transfert. Au sein du complexe IscU/IscS, les cystéines d'IscU se situent à 12-16Å du site actif de la désulfurase, ce qui est rendu possible par l'importante souplesse de la boucle contenant la cystéine active d'IscS (Shi et al., 2010). Nous reviendrons ci-après sur l'aspect transfert de soufre depuis IscS vers IscU.

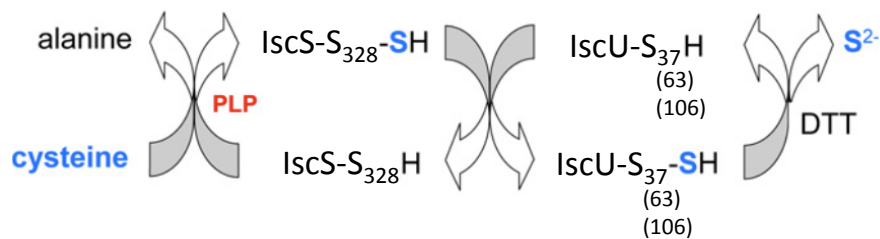
La protéine IscU est également capable d'interagir avec la chaperonne HscA (2) et la co-chaperonne HscB (3). Les domaines d'interactions entre IscU et HscA (2) ont été identifiés et se résument pour IscU au motif LPPVK (Figure 11) (Cupp-Vickery et al., 2004). Il a été récemment suggéré que l'isoforme « désordonnée » d'IscU aurait une meilleure affinité pour HscA que son isoforme « ordonnée » (Kim et al., 2012b). Parallèlement à cela, des études structurales et fonctionnelles ont été réalisées sur HscB (3) et IscU et ont permis d'identifier leurs régions d'interactions par RMN (Füzéry et al., 2008; Kim et al., 2009). Le complexe formé entre ces deux protéines est de type  $\alpha 1\beta 1$ . HscB se fixe sur le premier brin  $\beta$  ainsi que



**Figure 12 :** Modèle (*in silico*) du complexe entre Isu (IscU levure) et Jac1 (HscB levure)

**Jac1 :** En rouge les résidus chargés négativement. En orange les résidus hydrophobes. **Isu1 :** En bleu, les résidus chargés positivement. En jaune les résidus hydrophobes, dont l'implication dans l'interaction Isu/Jac1 a été confirmée expérimentalement.

(Issue de Majewska et al. 2013)



**Figure 13 :** Mécanisme de transpersulfuration

Le soufre est extrait de la cystéine par IscS et forme un persulfure sur sa cystéine catalytique. L'atome de soufre (bleu) du persulfure peut être transféré sur les cystéines d'IscU. La réduction du persulfure par le DTT libère le soufre sous forme S<sup>2-</sup>.

(Adaptée de Fontecave et Ollagnier-de-Choudens, 2008)

la dernière hélice  $\alpha$  d'IscU. Récemment, des études dans le modèle levure ont permis de suggérer qu'il semble exister un recouvrement partiel de la zone d'interaction de Jac1 (HscB) et Isu avec celle entre Isu et Nfs1 (IscS) (Figure 12) (Majewska et al., 2013). En opposition avec les caractéristiques de l'interaction HscA/IscU, c'est l'isoforme « ordonnée » d'IscU qui semble avoir une meilleure affinité pour HscB et non son isoforme « désordonnée » (Kim et al., 2012b).

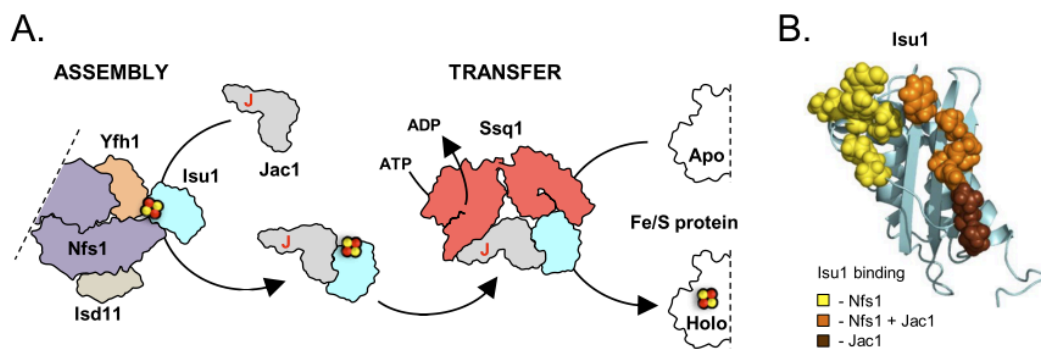
Enfin IscU a été proposée comme interacteur de la frataxine (4). Nous reviendrons en détails sur cette interaction dans le chapitre consacré à la frataxine. Il n'existe à ce jour aucune information permettant de suggérer quelle est la nature structurale de leur interaction. L'implication très vraisemblable d'un tryptophane exposé sur la frataxine dans leur interaction directe permet cependant de faire des hypothèses que nous présenterons dans la discussion.

#### *E.4. Le fer, le soufre et IscU*

Puisqu'IscU est la protéine d'échafaudage pour les clusters FeS, différentes équipes ont tenté de comprendre comment le fer (1) et le soufre (2) pouvaient se fixer dessus, et dans quel ordre. Différentes études font état de l'absence (Adinolfi et al., 2004a; Smith et al., 2001) ou de la très faible (Cook et al., 2010; Nuth et al., 2002) fixation de fer directement sur IscU. Quelles que soient ces contradictions, il n'a jamais été démontré qu'une fixation du fer sur IscU était possible directement sur ses cystéines. C'est la raison pour laquelle il est globalement accepté que le fer n'est pas le premier élément à arriver sur la protéine d'échafaudage lors de la formation de clusters FeS (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008).

A l'inverse, il a été très tôt démontré que le « chargement » en soufre des cystéines d'IscU était possible par un mécanisme de transpersulfuration (Figure 13) (Urbina et al., 2001). Ce mécanisme consiste en un transfert d'atomes de soufre depuis la cystéine active de la cystéine désulfurase vers la protéine d'échafaudage, ceci en l'absence d'un quelconque réducteur. La formation de complexes covalents entre IscS et IscU a pu être observée ainsi qu'une transpersulfuration sur l'ensemble des trois cystéines d'IscU (Smith et al., 2005). Deux limites importantes ont été observées : la première est que le mécanisme de transpersulfuration ne semble pas efficace à un ratio 1:1 d'IscU et IscS, ce qui met en perspective les observations précédentes (Smith et al., 2005). La seconde est qu'il semble que le mécanisme de transpersulfuration conduise à une « voie sans issue » pour la formation des clusters (Nuth et al., 2002). L'hypothèse d'une arrivée du soufre en premier est donc, elle aussi, mise à mal.

De nouvelles hypothèses ont été proposées comme la fixation du fer sur le persulfure de la cystéine essentielle d'IscS (Cys-S-S-Fe), puis le transfert d'unité S-Fe sur IscU (Layer et al., 2006). Plus récemment, l'observation d'une espèce fer-persulfide (Fe<sub>2</sub>-S-S) sur un cluster oxydé au sein du complexe IscS/IscU a permis de faire l'hypothèse de l'existence d'un



**Figure 14 : Rôle de Jac1 (HscB) dans le transfert des clusters FeS**

(A) Modèle proposé du mécanisme de transfert des clusters FeS chez la levure : rôle de Jac1 (homologue de HscB). Les clusters FeS sont synthétisés sur le complexe Nfs1/Isd11/Isu1/Yfh1 (Yfh1 est l'homologue de la frataxine). Jac1 reconnaît spécifiquement Isu1 avec un cluster et active sa dissociation du complexe. Jac1 active la fixation d'Isu1 sur Ssq1 (homologue de HscA) et promeut ainsi le transfert du cluster FeS vers une apo-protéine (B) Recouvrement partiel des zones de reconnaissance de Nfs1/Isd11 et de Jac1 sur Isu1. En jaune, la zone d'interaction en Isu1 et Nfs1, en brun foncé la zone d'interaction entre Isu1 et Jac1 et en orange la zone d'interaction commune.

(Issue de J. Majewska et al. JBC, 2013)

intermédiaire -S-S- sur IscU lors de la formation des clusters FeS (Marinoni et al., 2012). Quel que soit le mécanisme réel, il semble en tous cas vraisemblable qu'il soit concerté.

## F. HscA/HscB : le transfert des clusters FeS

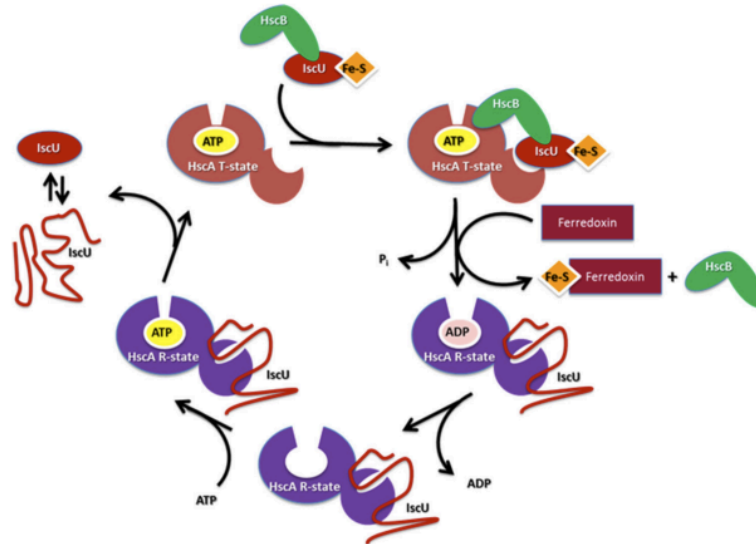
On retrouve dans l'opéron ISC une chaperonne ainsi qu'une co-chaperonne, nommément HscA et HscB, deux protéines essentielles pour le transfert des clusters FeS (Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Si ces deux protéines sont retrouvées quasiment dans tous les organismes vivants, leur absence coïncide systématiquement avec l'absence d'une autre protéine de la machinerie ISC : la frataxine, dont le gène la codant se trouve hors de l'opéron bactérien (Huynen et al., 2001). En effet, et je cite, « non seulement les gènes codant pour HscA et HscB ont émergé dans la même lignée évolutive que celui codant pour la frataxine, mais ils ont également été perdus de manière concomitante au moins deux fois, et ont été horizontalement transférés ensemble au cours de l'évolution dans l'organisme qui est devenu la mitochondrie » (Huynen et al., 2001). Il semble évident, dès lors, que comprendre parfaitement le rôle de ces deux protéines, HscA et HscB, est capital pour comprendre celui de la frataxine qui, je le rappelle, est au centre de mes études.

### F.1. HscB : l'initiation du transfert des clusters FeS

HscB est une co-chaperonne de type J (Vickery and Cupp-Vickery, 2007) et fait environ 25kDa. Elle a très tôt été décrite comme le partenaire d'HscA dans les modèles bactérien (Hoff et al., 2000) et levure, où HscB s'appelle Jac1 (Voisine et al., 2001). La structure de cette protéine est parfaitement connue chez la bactérie (Füzéry et al., 2008, 2011), la levure (Ciesielski et al., 2012) ainsi que l'humain (Bitto et al., 2008), où elle possède un domaine en doigt de zinc additionnel.

Son interaction avec IscU a également été parfaitement caractérisée (Ciesielski et al., 2012; Füzéry et al., 2008, 2011; Kim et al., 2009). A ce jour, quel que soit l'organisme modèle utilisé, HscB apparaît comme une co-chaperonne qui possède une forte affinité pour la forme structurée d'IscU, observée en présence de clusters [2Fe-2S], de zinc ou de la mutation D39A (Cai et al., 2013; Kim et al., 2009, 2012b). Cette interaction, présentée comme essentielle *in vivo* dans le modèle levure (Ciesielski et al., 2012), initie véritablement le mécanisme de transfert de clusters FeS vers HscA (Figure 14) : en effet, en l'absence de la co-chaperonne HscB, IscU[2Fe-2S] n'interagit que très peu avec la chaperonne HscA (Hoff et al., 2000), la chaperonne capable de promouvoir le transfert vers les apo-protéines.

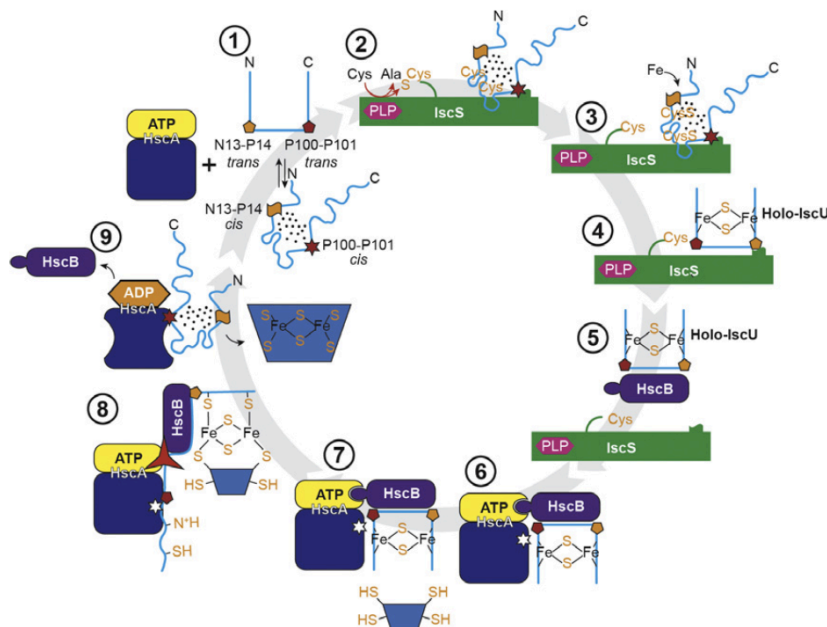
Parallèlement à cela, il est important de rappeler qu'HSC20, l'homologue humain d'HscB, a été proposé comme étant un interacteur potentiel de la frataxine dans des études sur le modèle mammifère (Shan and Cortopassi, 2011). Ces résultats sont cependant controversés dans la mesure où les co-immunoprécipitations de GST-pulldown réalisés ne peuvent exclure une interaction indirecte.



**Figure 15 : Modèle proposé du mécanisme de transfert des clusters FeS chez la bactérie : dynamique d'HscA**

Le cycle débute par l'arrivée du complexe HscB/IscU[2Fe-2S] sur HscA sous sa forme « T » (tendue, en présence d'ATP). L'arrivée d'une apo-proteine (ici la ferrédoxine) et le transfert sur cette dernière du cluster FeS induit le relargage d'HscB, l'hydrolyse de l'ATP et donc le changement conformationnel d'HscA sous sa forme « R » (relâchée, en absence d'ATP), ce qui promeut la fixation d'IscU sur HscA (par le motif LPPVK). Le relargage de l'ADP n'a pas de conséquence sur le complexe HscA/IscU, mais l'arrivée d'ATP le libère de cette interaction.

(Issue de J. H. Kim et al. JBC. 2012)



**Figure 16 : Modèle proposé du mécanisme de formation et de transfert des clusters [2Fe-2S] d'IscU vers une apo-proteine par HscA et HscB**

(1) IscU existe sous deux formes conformationnelles, l'une structurée « S » (caractérisée par les résidus Asn13-Pro14 et Pro100-Pro101 en *trans*) et l'autre partiellement déstructurée « D » (N13-P14 et P100-P101 en *cis*). (2) IscS fixe préférentiellement la forme « D ». (3) Biosynthèse des clusters FeS par extraction du sulfure par IscS et arrivée de fer. (4) IscU passe sous la forme « S » après la formation d'un cluster [2Fe-2S]. (5) HscB, qui a une meilleure affinité pour la forme « S », récupère IscU et son cluster FeS. (6) Le complexe HscB/IscU[2Fe-2S] est reconnu par HscA. HscB se fixe sur le domaine de fixation des nucléotides. (7) Une apo-proteine approche le complexe. (8) L'initiation du transfert du cluster FeS induit la déstructuration progressive d'IscU (forme « D ») ainsi qu'un changement conformationnel d'HscB, activant ainsi la fonction ATPase d'HscA. (9) La conversion de l'ATP en ADP induit un changement conformationnel du domaine de fixation d'IscU par HscA, ce qui permet leur interaction (par le motif LPPVK d'IscU). S'en suit le transfert du cluster et le relargage d'HscB. (9->1) L'échange d'ADP pour de l'ATP induit le relargage d'IscU, qui entre à nouveau dans le cycle.

(Issue de J. Markley et al. FEBS Letter, 2013)

## *F.2. HscA : le transfert des clusters FeS sur les apo-protéines*

HscA, une chaperonne de la famille des HSP70, est une protéine d'un peu plus de 65kDa. Elle est, à ce titre, la plus imposante protéine de la machinerie ISC (Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Elle est composée d'un premier domaine de fixation des nucléotides (ATP/ADP) (NBD : nucleotide binding domain) et d'un second domaine de fixation de sa protéine cible (SBD : substrate binding domain), en l'occurrence le motif « ELPPVKIHC » d'IscU (Cupp-Vickery et al., 2004; Hoff et al., 2003). L'homologue levure de HscA est Ssq1 (Lutz et al., 2001). Chez les eucaryotes supérieurs, l'homologue « fonctionnel » d'HscA est l'unique chaperonne mitochondriale HSP70, également appelé GRP75 ou mortaline (Cai et al., 2013). Du point de vue phylogénétique, HSP70 est en réalité l'orthologue de Ssc1, une chaperonne levure fonctionnellement capable de compenser l'absence de Ssq1 (Vickery and Cupp-Vickery, 2007).

Si les études originelles sur cette chaperonne ont d'abord suggéré un rôle dans l'import et/ou la maturation de la frataxine (Knight et al., 1998; Voisine et al., 2000), il est désormais admis que sa fonction essentielle est d'initier le transfert des clusters FeS depuis la protéine d'échafaudage IscU vers les apo-protéines (Vickery and Cupp-Vickery, 2007). En présence du complexe HscB/IscU[2Fe-2S] et suite à la fixation d'HscB sur le NBD d'HscA, l'activité ATPase d'HscA est significativement augmentée (Hoff et al., 2000) ce qui promeut un changement conformationnel d'HscA et le « trapping » d'IscU sur le SBD par son motif LPPVK. Ce « trapping » induit non seulement le changement conformationnel d'IscU nécessaire au transfert du cluster [2Fe-2S], mais provoque aussi le relargage d'HscB (Silberg et al., 2004). Un seul ATP est nécessaire au transfert d'un cluster [2Fe-2S] (Bonomi et al., 2008) et le remplacement de l'ADP par un nouvel ATP induira enfin le relargage d'IscU (Figure 15).

## *F.3. HscA/HscB : aspect mécanistique du transfert*

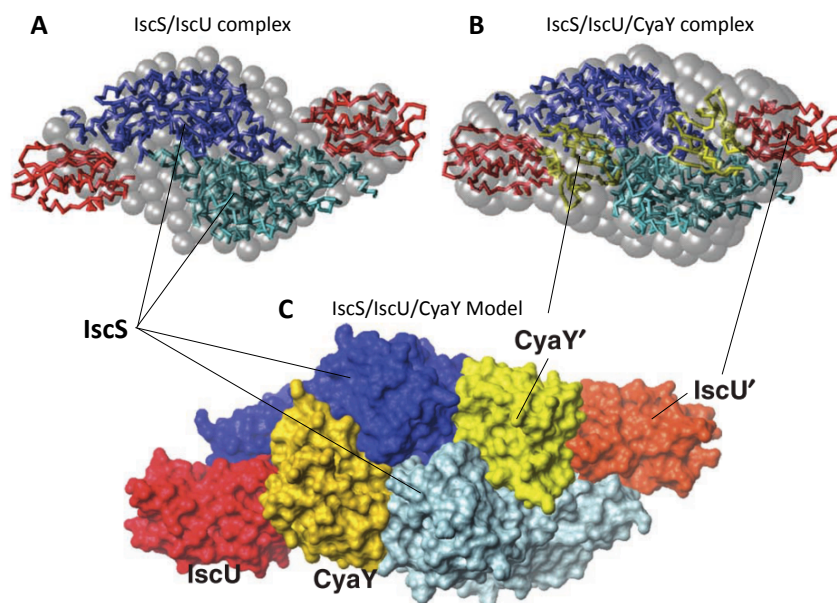
L'importance catalytique de HscA et HscB dans le transfert des clusters [2Fe-2S] depuis IscU vers la ferrédoxine a été démontrée (Figure 16) (Bonomi et al., 2008; Chandramouli and Johnson, 2006). De manière inattendue, ils ne semblent pas être efficaces pour promouvoir le transfert des clusters [4Fe-4S] depuis IscU vers l'aconitase (Unciuleac et al., 2007). Ceci s'ajoute au constat surprenant que seule une faible fraction des clusters [4Fe-4S] d'IscU semble être transférable vers l'aconitase (Unciuleac et al., 2007), observations également faites dans le modèle mammifère (Colin et al., 2013). Comme l'ont conclu Mike Johnson et Denis Dean (Unciuleac et al., 2007), ceci suggère qu'un composant clé manque pour le transfert de ce type de clusters, par exemple une protéine qui serait capable d'optimiser la conformation d'IscU et/ou des clusters [4Fe-4S] afin de les rendre plus transférables. Partant de ce constat, l'implication possible de la frataxine est, me semble-t-il, digne d'intérêt. Nous y reviendrons dans le chapitre consacré à cette protéine et dans la



Homologue humain	Homologue levure	Homologue bactérien	Fonction
NFS1	Nfs1	IscS	Cystéine désulfurase
ISD11 ( <i>LYRM4</i> )	Isd11	--	Stabilisation/Activation de NFS1
ISCU	Isu1/2	IscU	Echafaudage du cluster FeS
FXN	Yfh1	CyaY	Donneur de fer ? / Régulateur ? / Stabilisateur ?
FDX2 ( <i>FDXL</i> )	Yah1	Fdx	Donneur d'électrons ?
FDXR	Arh1	--	Réduction de la ferrédoxine
--	Ssq1	HscA	Chaperonne (transfert des FeS)
mHSP70	Ssc1	--	
HSC20	Jac1	HscB	Co-chaperonne (transfert des FeS)

**Tableau 1 :** Protéines impliquées dans les étapes précoces de biosynthèse des clusters FeS chez les mammifères.

Les orthologues et fonctions proposées sont décrits. Sont exclues les protéines impliquées dans les étapes plus tardives.



**Figure 17 :** Structure du complexe IscS/IscU/CyaY

(A) Docking des protéines IscS et IscU dans le jeu de données obtenu par SAXS. (B) Docking des protéines IscS, IscU et CyaY dans le jeu de données obtenu par SAXS. (C) Modèle proposé du complexe IscS/IscU/CyaY.

(Adaptée de Prischi et al. 2010)

discussion. L'ensemble des protéines précédemment décrites, essentielles à la compréhension de mes travaux, sont réunies dans le [tableau 1](#).

### **G. Les autres protéines de la machinerie ISC**

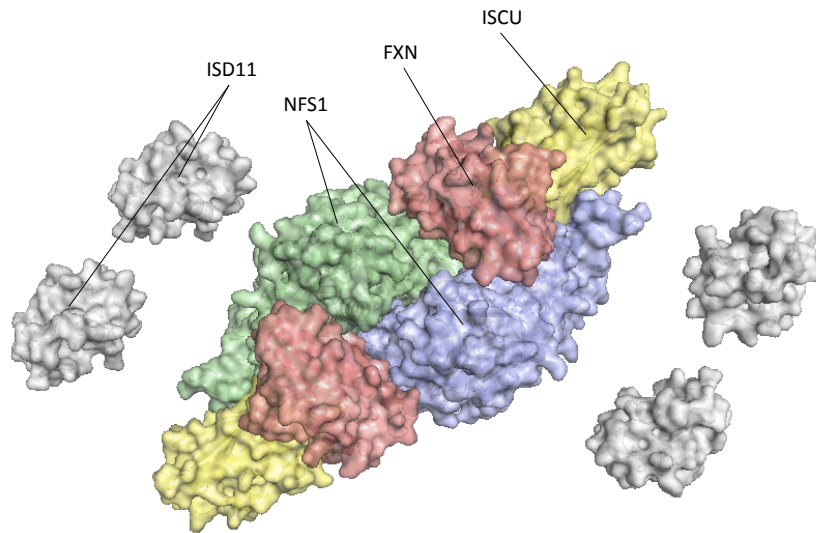
Un grand nombre d'autres protéines sont impliquées dans la machinerie de biosynthèse des clusters FeS au premier rang desquelles on peut citer IscA. En effet, cette protéine qui est présente dans l'opéron bactérien ISC n'a à ce jour pas de fonction clairement établie. De nombreuses observations permettent cependant de faire différentes hypothèses quant à son rôle comme donneur de fer, protéine d'échafaudage alternative à IscU, ou encore « transporteur » de clusters pour certaines protéines FeS telles que l'aconitase mitochondriale dans le modèle levure (Lill, 2009). Quelle qu'elle soit, il apparaît que sa fonction ne soit pas aussi essentielle que celle de nombreuses autres protéines de la machinerie ISC puisque sa délétion dans le modèle bactérien n'a que peu d'effets sur la survie (Johnson et al., 2005).

IscX (ou YfhJ), dernière protéine codée par l'opéron, n'a à ce jour pas de fonction connue. Il est cependant important de noter que la double délétion CyaY(frataxine)/IscX chez la bactérie entraîne un déficit de croissance, non observé dans le cas d'une délétion simple (Skovran et al., 2004; Vivas et al., 2006). Par ailleurs, la caractérisation structurale de cette protéine a permis de conclure à une « remarquable similarité » (Pastore et al., 2006) entre elle et CyaY. Cette observation est par ailleurs confirmée fonctionnellement par la démonstration qu'IscX est capable de se fixer sur IscS et le complexe IscS/IscU en utilisant le même site de fixation que CyaY (Shi et al., 2010).

D'autres protéines, comme la Glutaredoxine 5 (GLRX5) ont été proposées comme essentielles lors de l'étape de transfert (et/ou de stockage) des clusters FeS (Bandyopadhyay et al., 2008b; Shakamuri et al., 2012). Le facteur d'échange de nucléotides Mge1 semble également être nécessaire pour la régénération de l'ATP dans le domaine NBD des chaperonnes Ssq1 et Ssc1 (Schmidt et al., 2001). La protéine Iba57 pourrait être impliquée dans la maturation des clusters FeS de l'aconitase mitochondriale. Ind1 et Nfu1 auraient des rôles spécifiques pour l'assemblage des clusters FeS sur le complexe I de la chaîne respiratoire (Lill, 2009). Malgré cela, nous sommes encore loin de réaliser ce que sont les mécanismes de biosynthèse et de transfert des clusters FeS dans leur ensemble.

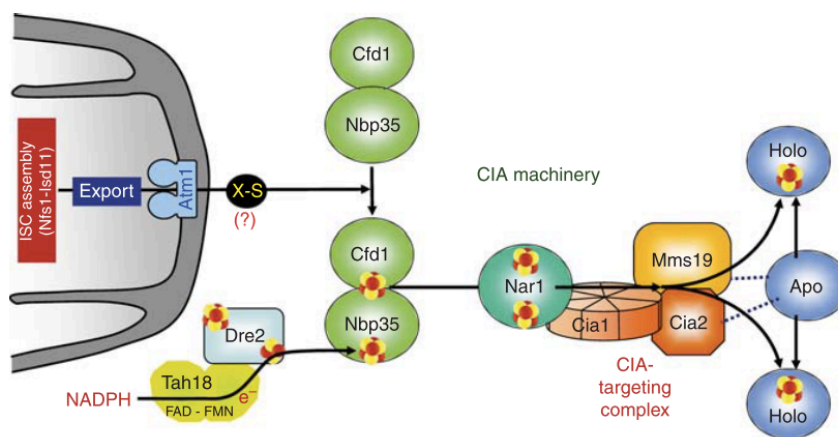
### **H. Les complexes de biosynthèse des clusters FeS**

Le concept de « complexe » de biosynthèse des clusters FeS est de plus en plus admis. Désormais, la cystéine désulfurase IscS/NFS1 apparaît, par sa taille et ses nombreuses interactions, plutôt comme une plateforme de biosynthèse des clusters que simplement un donneur de soufre, et prend ainsi une place centrale dans cette étape initiale. A ce jour, les complexes IscS/IscU ([Figure 7](#)) (Shi et al., 2010), IscS/CyaY (Prischi et al., 2010b), IscS/IscU/CyaY ([Figure 17](#)) (Prischi et al., 2010b), IscS/Fdx (Kim et al., 2013) et leurs



**Figure 18 : Modèle du complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN**

Le dimère de NFS1 est en vert et bleu. ISCU est en jaune, la frataxine en rouge et ISD11 en gris. La structure du complexe NFS1/ISCU a été modélisée par SWISSPROT à partir de la structure du complexe IcsS/IscU sans cluster FeS (Shi & al. 2010). La position de la frataxine est en adéquation avec le modèle proposé du complexe IcsS/IscU/CyaY (Prischi et al. 2010).



**Figure 19 : Machinerie CIA chez la levure**

La machinerie CIA est composée de neuf protéines. Dans un premier temps, un cluster FeS est formé sur le complexe d'échafaudage Cfd1/Nbp35. Cette réaction nécessite une source de sulfure (X-S) produit par la machinerie de biosynthèse ISC des clusters FeS dans la mitochondrie et exporté par Atm1 (ABCB7). La génération d'un second cluster fonctionnellement essentiel sur Nbp35 est assurée par Dre2 et Tah18 par un mécanisme NADPH dépendant. Le relargage du cluster situé à l'interface de Cfd1/Nbp35 nécessite Nar1 et le complexe Cia1-Cia2-Mms19 (Targeting complex). Cia2 et Mms19 sont capables d'interagir avec les protéines cibles et assurent la spécificité du transfert des clusters FeS.

(Issue de Stehling et Lill, 2013)

équivalents eucaryotes NFS1/ISD11/ISCU (Tsai and Barondeau, 2010), NFS1/ISD11/ISCU/FXN (Figure 18) (Schmucker et al., 2011), et NFS1/ISD11/FDX (Stéphane Schmucker, données non publiées) ont été observés et seront de mieux en mieux caractérisés. Des études sur des complexes contenant des clusters FeS sont initiées, comme c'est le cas pour les complexes IscS/IscU[2Fe-2S] (Marinoni et al., 2012) ou dans nos propres travaux sur le modèle mammifère (Colin et al., 2013; Schmucker et al., 2011).

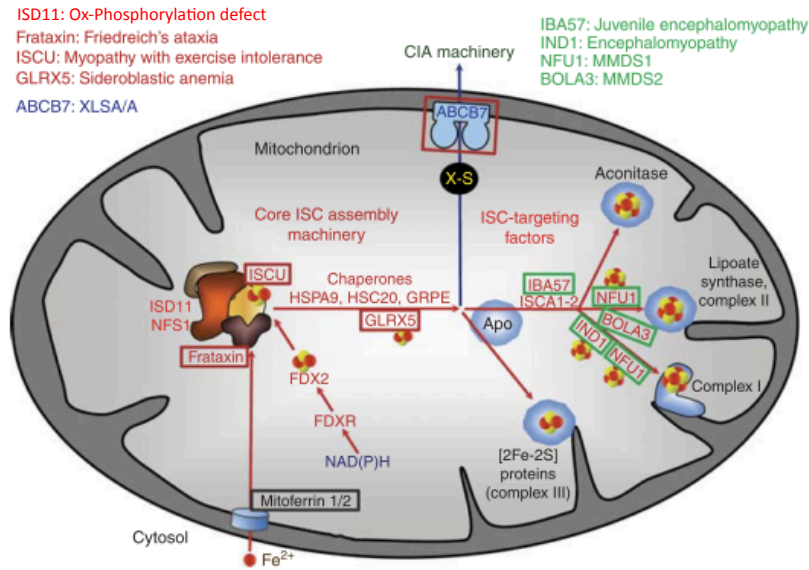
### **1.5. Machinerie extramitochondriale**

Chez les eucaryotes, la machinerie de biosynthèse des clusters FeS est mitochondriale. Or, nombre de protéines FeS sont extramitochondriales. Si certaines études suggèrent l'existence d'une éventuelle machinerie ISC cytosolique (Ye and Rouault, 2010), cette hypothèse reste à ce jour particulièrement controversée. La maturation des protéines FeS extramitochondriales implique un mécanisme permettant l'export de tout, ou partie, des clusters FeS vers les apo-protéines situées en dehors de la mitochondrie. La plupart des études ont été jusqu'à présent réalisées sur le modèle levure et ont permis d'identifier les différents partenaires de la machinerie CIA d'assemblage des clusters FeS extramitochondriaux (Figure 19) (Stehling and Lill, 2013).

L'hypothèse actuelle suggère qu'une espèce soufrée (X-S) produite par la machinerie ISC mitochondriale serait exportée vers le cytosol par l'intermédiaire de la « machinerie d'export ISC » composée d'un transporteur transmembranaire (Atm1/ABCB7), d'une sulfhydryl oxydase de l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Erv1) et du glutathion (Stehling and Lill, 2013). Ce précurseur soufré serait ensuite utilisé par la machinerie CIA composée de neuf protéines, la plupart étant probablement elles-mêmes des protéines FeS (Stehling and Lill, 2013).

### **1.6. Maladies associées à des défauts de la machinerie ISC**

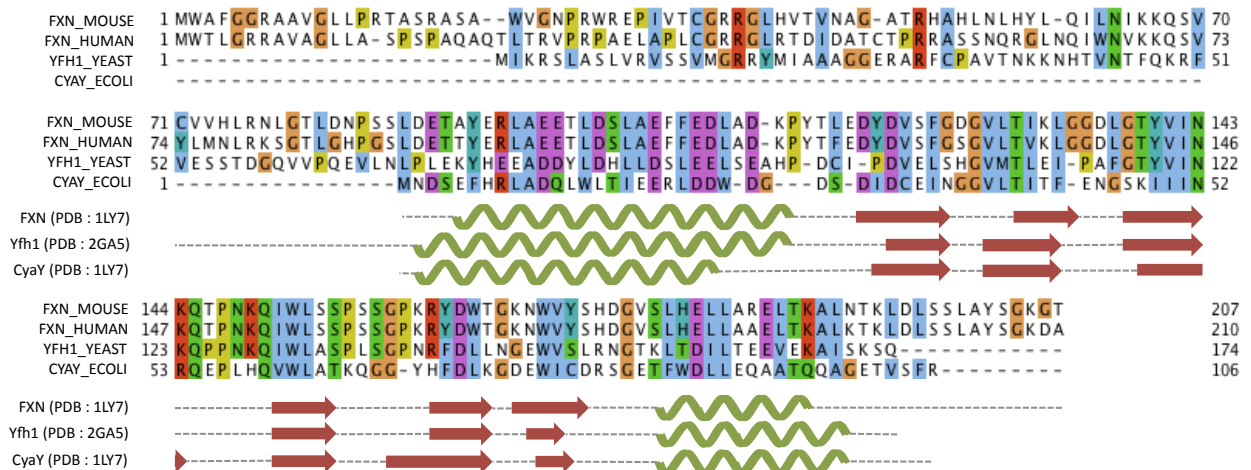
A ce jour, des mutations dans les protéines de la biosynthèse et du transfert des clusters FeS sont responsables de différentes maladies (Stehling and Lill, 2013). (1) L'ataxie de Friedreich (AF) est causée par une expansion introniques de triplets (GAA)<sub>n</sub> dans le gène codant pour la frataxine. Cette maladie est étudiée au laboratoire et nous y reviendrons dans la dernière partie de cette introduction. (2) Différentes mutations affectant l'épissage d'ISCU entraînent une myopathie associée à une intolérance à l'effort. (3) Des mutations dans le gène codant le transporteur ABCB7 entraîne une anémie sidéroblastique avec une ataxie liée au chromosome X. (4) Une mutation dans l'épissage du gène de la Glutaredoxine 5 entraîne une anémie sidéroblastique. (5) Récemment, une mutation R68L dans Isd11 a été identifiée chez des patients présentant une anomalie de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Lim et al., 2013).



**Figure 20 : Maladies associées à des défauts de la biosynthèse des clusters FeS.**

En rouge les maladies associées à des défauts dans les étapes précoces de la machinerie ISC. En vert celles associées à des défauts dans les étapes tardives de la machinerie ISC. En bleu, la maladie associée à un défaut dans la machinerie d'export nécessaire à la maturation des protéines FeS extramitochondriales.

(Adaptée de Stehling et Lill, 2013)



**Figure 21 : Conservation de la frataxine au cours de l'évolution**

Alignement multiple des frataxine souris, humaine, levure (Yfh1) et bactérienne (CyaY). Sont également représentées les structures secondaires : en vert les hélices  $\alpha$  et en rouge les brins composant le feuillet  $\beta$  des différents orthologues de la frataxine.

D'autres mutations dans quatre protéines impliquées dans l'étape plus tardive du transfert des clusters FeS ont été identifiées. (1) Une mutation ponctuelle dans Iba57 a été identifiée chez un patient présentant une encéphalopathie juvénile. (2) Différentes mutations dans IND1 ont également été observées chez des patients atteints d'encéphalopathie. (3 et 4) Des mutations dans NFU1 ou BOLA3 ont été observées chez des patients présentant un « syndrome de dysfonction multiple de la mitochondrie » (MMDS) (Stehling and Lill, 2013). C'est au total pas moins de neuf maladies qui sont associées aux machineries de biosynthèse et de transfert des clusters FeS (Figure 20) (Stehling and Lill, 2013).

## II - La frataxine

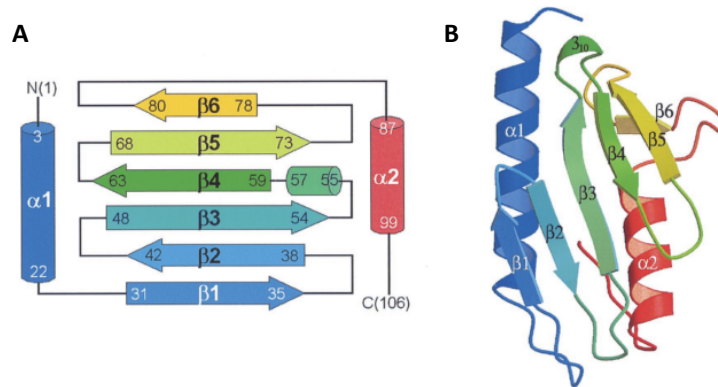
### II.1. Conservation, structure, localisation et maturation de la frataxine

#### II.1.1. Conservation et structure de la frataxine

La frataxine est une protéine ubiquitaire chez l'Homme avec des niveaux d'expression plus importants au niveau du cœur, de la moelle épinière et des ganglions dorsaux rachidiens (Koutnikova et al., 1997). Cette protéine est retrouvée tout au long de l'évolution depuis la plupart des bactéries Gram négatives, famille contenant notamment l'ancêtre des mitochondries, jusqu'aux eucaryotes (Huynen et al., 2001). Sa présence n'a cependant jamais été observée ni chez les bactéries Gram positives, ni les archéobactéries (Gibson et al., 1996). Le domaine conservé de la frataxine contient entre 100 et 125 acides aminés et présente 22% d'identité et plus de 60% de similarité dans l'ensemble de la famille (Adinolfi et al., 2002). Cette région est précédée chez les eucaryotes d'une région N-terminale extrêmement variable dont le rôle dans l'adressage mitochondriale sera discuté ci-après (Figure 21).

Les structures des différents homologues de la frataxine ont été établies chez *E. Coli* (Cho et al. 2000; Nair et al. 2003, 2004), *S. Cerevisiae* (He et al., 2004) et l'Homme (Dhe-Paganon et al., 2000). Des structures trimériques et oligomériques de la frataxine levure mutée (Y73A) ont également été caractérisées (Karlberg et al., 2006; Schagerlöf et al., 2008). Les premières analyses faites par rayons-X sur les cristaux de la frataxine humaine (domaine 88-210) (Dhe-Paganon et al., 2000) puis par RMN (domaine 92-210) (Musco et al., 1999, 2000) ont révélé que la frataxine possédait une conformation complètement nouvelle en sandwich  $\alpha/\beta$ . La résolution de la structure de l'homologue bactérien par rayons-X (Cho et al. 2000) puis par RMN (Nair et al. 2003, 2004) ainsi que de la forme complète de l'homologue levure par RMN (He et al., 2004) l'ont confirmé. Plus récemment, la protéine Nqo15, sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire chez *T. Thermophilus*, a été montrée comme possédant une conformation similaire (Berrisford and Sazanov, 2009). Même si la similarité structurale n'implique pas nécessairement une similarité fonctionnelle, il est possible que la frataxine et Nqo15 aient des fonctions proches.

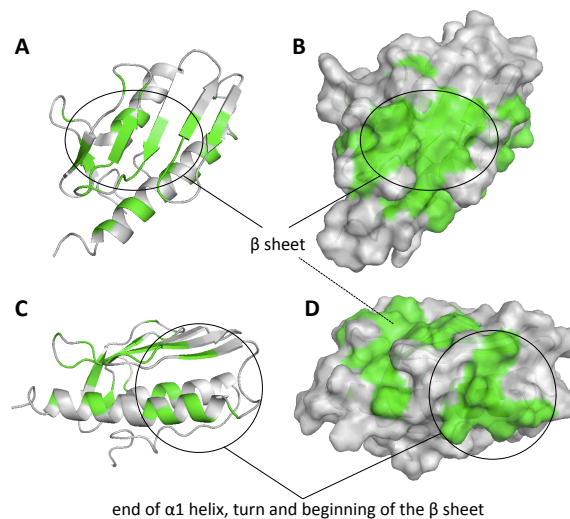
La structure de la frataxine a été décrite comme possédant 5 à 7 brins  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$ . La présence additionnelle d'une pseudo hélice a été observée dans la partie N-terminale non



**Figure 22 : Structures de la frataxine**

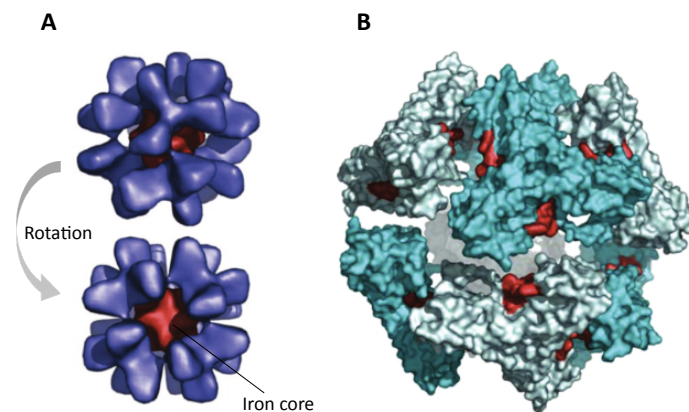
Structures secondaire (A) et tertiaire (B) de la frataxine. La structure de CyaY est présentée ici, elle est identique à celle de tous ses orthologues.

(Issue de Cho et al. 2000)



**Figure 23 : Régions conservées de la frataxine**

(A et B) Feuille β de la frataxine, contenant notamment le tryptophane 155. (C et D) La fin de l'hélice α1, la boucle et le premier brin du feuillet β, contenant notamment un grand nombre de résidus chargés négativement.



**Figure 24 : Structure oligomérique de la frataxine**

(A) Reconstruction 3D des oligomères de la frataxine levure (Yfh1 Y73A) à partir des données de microscopie électronique. En rouge le fer stockée à l'intérieur des oligomères. (B) Modèle des oligomères de frataxine en réalisant le docking de la structure trimérique (obtenue par cristallographie) avec les données de microscopie électronique. Sont indiqués en rouge les sites de ferroxidation de Yfh1.

(Adaptée de Schagerlöf et al. 2008)

conservée de la levure (He et al., 2004) mais pas chez l'Homme (Prischi et al., 2009). Les brins forment ensemble un feuillet  $\beta$  antiparallèle de plus de 1000 Å<sup>2</sup> qui a très tôt été proposé comme plateforme d'interaction (Dhe-Paganon et al., 2000; Musco et al., 2000). Les deux hélices se trouvent aux extrémités N- et C-terminales de ce feuillet, se rapprochant parallèlement l'une de l'autre sur le dessous du feuillet  $\beta$  (Figure 22) (Cho et al., 2000).

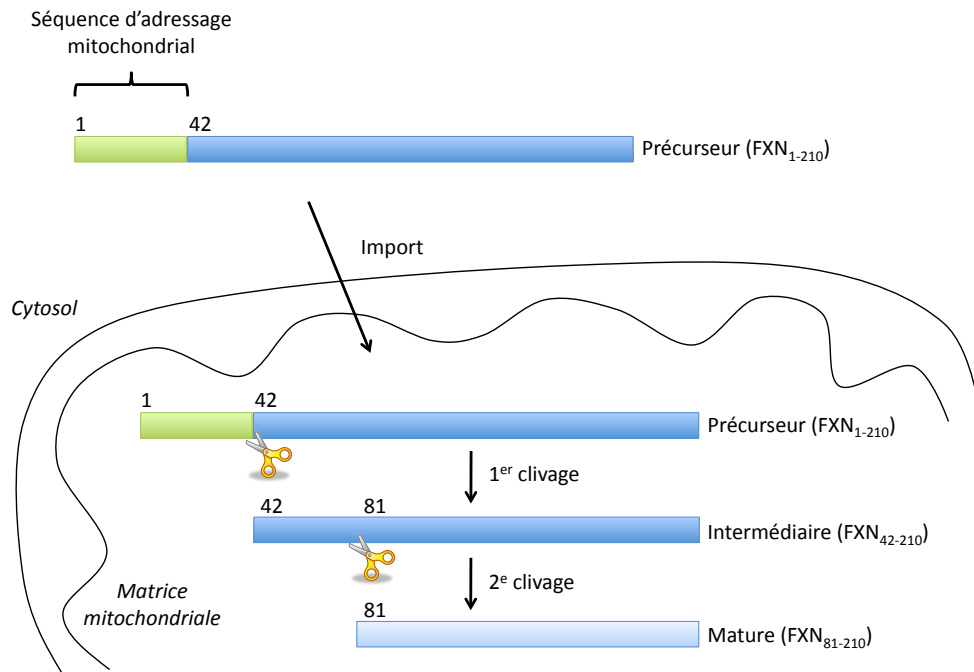
L'analyse des structures et du degré de conservation des résidus a permis d'identifier différentes régions de la frataxine. Elle a également permis d'identifier les résidus potentiellement importants pour sa fonction ou le maintien de sa structure. Pour plus de facilité, nous utiliserons la numérotation des résidus de la frataxine humaine. La première région (Ser89 à Ser126, 21% ID, 63% Sim) contient la première hélice  $\alpha$  et le premier brin  $\beta$ , et forme un patch de résidus chargés négativement (Dhe-Paganon et al., 2000). La seconde (Phe127 à Leu182, 29% ID, 62.5% Sim) contient le reste du feuillet  $\beta$  et est la région la plus conservée de la frataxine (Adinolfi et al., 2002). Enfin, la dernière contient la seconde hélice  $\alpha$  (His183-Ala210, 12.5% ID, 37.5% Sim) et est peu conservée. *ID = identité ; Sim = similarité (comparaison Homme/E. Coli)*

**La région  $\alpha 1$ - $\beta 1$  (Figure 23) :** Que ce soit chez la bactérie ou l'Homme, la première région contient entre 12 et 13 résidus chargés négativement, la plupart étant exposés. Les plus conservés sont les résidus E100, E108, E111 et enfin le D124, seul à l'être parfaitement au cours de l'évolution (Adinolfi et al., 2002). La présence de ces résidus a poussé la communauté scientifique à proposer un rôle de fixation du fer (Adamec et al., 2000; Dhe-Paganon et al., 2000). Cependant, l'absence de réelles poches de coordination du fer et des résidus habituels pour sa fixation comme les histidines rend cette fonction discutable pour la frataxine sous sa forme isolée et monomérique (Pastore et al., 2007). L'hypothèse d'une interaction avec Isu à partir de cette zone a également été proposée très tôt (Foury et al., 2007). Notons également le résidu Y95, résidu cyclique très conservé puisqu'il est remplacé par une phénylalanine le cas échéant. Ce résidu de l'hélice  $\alpha 1$  est orienté vers l'intérieur de la structure, en direction du feuillet  $\beta$ , et doit être muté en alanine pour stabiliser l'oligomérisation de la frataxine levure en l'absence de fer.

**Le feuillet  $\beta$  (Figure 23) :** Le feuillet  $\beta$  concentre les résidus les plus conservés de la frataxine. Certains d'entre-eux sont orientés vers l'intérieur de la structure et doivent avoir un rôle plutôt structurant comme les résidus I145, I154, Y166 ou W173. D'autres sont clairement exposés à la surface et sont très probablement impliqués dans les interactions avec les partenaires de la frataxine comme par exemple les résidus N146, Q148, Q153 ou W155. En tout, plus d'une dizaine de résidus exposés sont conservés sur cette plateforme.

**Superstructure en oligomère (Figure 24) :** Les structures disponibles en trimère ne sont pas en désaccord avec la structure de la frataxine monomérique (Karlberg et al., 2006). Les données disponibles en microscopie électronique ont d'ailleurs permis de modéliser les





**Figure 25 : Maturation de la frataxine humaine**

La frataxine est synthétisée dans le cytosol sous forme d'un précurseur de 210 acides aminés, contenant une séquence d'adressage mitochondrial (FXN<sub>1-210</sub>). Lors de son import dans la mitochondrie, le précurseur est clivé à deux reprises par la MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) (symbolisée par des ciseaux) : d'abord entre les acides aminés 41 et 42, puis entre les acides aminés 80 et 81. La FXN<sub>81-210</sub> est la forme mature et fonctionnelle de la frataxine humaine. *FXN* : frataxine.

oligomères qui sont un assemblage de huit trimères soit vingt-quatre frataxines (Karlberg et al., 2006; Schagerlöf et al., 2008). Bien que nous reviendrons plus tard sur l'aspect fonctionnel de ces oligomères, il est cependant important de noter que la formation du trimère implique structuralement la seconde hélice  $\alpha$ , les deux derniers brins du feuillet  $\beta$ , la partie N-terminale non conservée ainsi qu'une mutation Y95A (Karlberg et al., 2006), soit en somme les régions les moins conservées et la mutation d'un résidu important, ce qui est surprenant.

### II.1.2. Localisation et maturation de la frataxine

Chez les eucaryotes, la frataxine est une protéine codée par le génome nucléaire qui dispose d'une séquence d'adressage mitochondrial (Koutnikova et al., 1997). Bien qu'initialement décrite comme étant préférentiellement localisée au niveau des membranes mitochondriales (Campuzano et al., 1997), il est désormais admis qu'il s'agit d'une protéine matricielle de la mitochondrie (Babcock et al., 1997; Long et al., 2008a). L'expression de la frataxine humaine chez *trypanosoma brucei*, un protiste de la famille des kinétoplastidés, a permis de prouver que le mécanisme de transfert de la frataxine vers la mitochondrie est non seulement nécessaire mais également conservé (Long et al., 2008b). L'hypothèse controversée d'une localisation partiellement cytosolique de la frataxine a également été émise (Acquaviva et al., 2005; Condò et al., 2006).

La traduction du gène codant la frataxine permet la formation d'un précurseur de 210 acides aminés, d'environ 25kDa. La séquence d'adressage lui permet d'entrer ensuite dans la mitochondrie où il subit une maturation atypique en deux étapes, réalisée par la MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) (Figure 25) (Branda et al., 1999; Koutnikova et al., 1998). Si le premier site de clivage entre les acides aminés 41 et 42 est globalement accepté (Fxn<sub>42-210</sub> - 19kDa), le second site fait l'objet de nombreuses controverses. En effet, une première étude a suggéré que le second site de clivage se situait entre les acides aminés 55 et 56 (Fxn<sub>56-210</sub> - 17kDa) (Cavadini et al., 2000). Par la suite deux groupes ont proposé un clivage soit entre les résidus 80 et 81 (Fxn<sub>81-210</sub> - 14.2kDa) (Condò et al., 2007), soit entre les résidus 77 et 78 (Fxn<sub>78-210</sub> - 14.5kDa) (Yoon et al., 2007). Afin de mettre un terme à toute ambiguïté, il a été démontré au sein du laboratoire que la forme Fxn<sub>81-210</sub> est majoritaire dans les cellules (Schmucker et al., 2008) et qu'elle est la forme nécessaire et suffisante *in vivo* (Schmucker et al., 2011). Cette démonstration se base sur l'utilisation d'une construction où la séquence d'adressage mitochondrial (1-41) est directement fusionnée à la forme mature (81-210), et « bypass » ainsi toute forme intermédiaire puisqu'aucun second clivage n'est possible. L'expression de cette construction dans des fibroblastes de souris a permis la survie des cellules, même s'il est apparu que la maturation était partiellement affectée. A défaut d'avoir un rôle essentielle, la région 56-80, et donc la possibilité de réaliser un second clivage, est nécessaire pour une maturation optimale (Schmucker et al., 2011).



## **II.2. Interactions de la frataxine**

### **II.2.1. Les protéines de la biosynthèse des centres FeS**

#### **A. La frataxine : membre du complexe de biosynthèse des FeS**

Parmi les interactions les plus décrites dans les différents modèles, procaryotes et eucaryotes confondus, on retrouve principalement des protéines impliquées dans la biosynthèse des centres FeS. Ces interactions sont d'ailleurs parfois multiples car elles nécessitent la présence simultanée de plusieurs partenaires (Figure 26).

Une des observations fondatrices a été faite par l'équipe de Roland Lill dans le modèle levure et a permis d'établir par GST-pulldown et co-immunoprécipitation que Yfh1 (Fxn levure) est capable d'interagir avec Nfs1 et Isu1 (Gerber et al., 2003) et que cette interaction est activée par la présence de fer. Cette observation, qui la première a suggéré que la frataxine était une sous-unité du complexe de biosynthèse des centres FeS, a par la suite été confirmée dans le modèle bactérien. En effet, CyaY (Fxn bactérienne) a été montrée comme pouvant interagir avec IscS et IscU par HIS-pulldown (Layer et al., 2006). Plus tard, la formation de ce complexe IscS/IscU/CyaY a été modélisée par SAXS et caractérisée par ITC (Prischi et al., 2010b). La formation du complexe analogue chez les mammifères NFS1/ISD11/ISCU/FXN a été observée par gel natif et gel filtration (Tsai and Barondeau, 2010) pour les orthologues humains et par GST-pulldown et spectrométrie de masse chez le modèle souris (Figures 17 et 18) (Schmucker et al., 2011).

Cependant les études divergent lorsqu'il s'agit de comprendre dans quel ordre ces interactions peuvent avoir lieu. En effet, si certaines études suggèrent que la frataxine serait le dernier membre à intégrer le complexe (Schmucker et al., 2011; Tsai and Barondeau, 2010), d'autres semblent proposer des hypothèses différentes. Dans le modèle bactérien, CyaY est ainsi capable d'interagir directement avec IscS et ceci en l'absence d'IscU (Layer et al., 2006; Prischi et al., 2010b). Rappelons que IscS et IscU interagissent également en l'absence de CyaY. Ceci suggère une chronologie plus subtile et plus dynamique dans le mécanisme de formation des complexes de biosynthèse des centres FeS. D'autres études viennent d'ailleurs alimenter cette dernière remarque, notamment celles impliquant une interaction directe entre la Fxn et ISCU en présence de fer (Yoon and Cowan, 2003).

#### **B. La frataxine : interaction directe avec ISCU/Isu**

Les premières observations d'une possible interaction directe entre la frataxine et ISCU ont été faites dans le modèle humain par fluorimétrie et ITC (Yoon and Cowan, 2003). A cette époque, la présence de fer avait été requise pour observer un signal et cette interaction n'avait pas été confirmée par des techniques habituelles, comme le pulldown. D'autres observations réalisées par gel-filtration (O'Neill et al., 2005a) ou par immunoprécipitation (Acquaviva et al., 2005) ont également suggéré la possibilité d'une interaction directe entre la frataxine et ISCU. Notre propre expérience suggère que cette interaction, si elle existe, n'est

Mutations in FXN	Iron interaction	Protein interaction	Additional features
H86A	Lower Iron binding <sup>20</sup>	-	-
E92A/E96A/E100A/E101A	Low Iron stoecho. <sup>21</sup>	Reduced <b>ISCU</b> affinity ? <sup>21</sup>	-
Y95G	-	Reduced <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	Yfh1 <sup>Y73A</sup> analogs <sup>22</sup>
E96K	-	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	-
E100A/E101A/D104A/E108A/E111A/D112A	Very low Iron stoecho. <sup>21</sup>	Reduced <b>ISCU</b> affinity ? <sup>21</sup>	-
D104G	-	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	-
L106S	-	-	Mild FRDA missense <sup>23</sup>
E108K	-	Reduced <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	-
E111K	-	Reduced <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	-
D115K	-	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	-
D115A/E121A/D122A/D124A	Low Iron stoecho. <sup>21</sup>	Reduced <b>ISCU</b> affinity ? <sup>21</sup>	-
D122Y	Lower Iron affinity <sup>24</sup>	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	Mild FRDA missense <sup>23</sup>
D124K	-	No <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	-
G130V	Lower Iron affinity <sup>24</sup>	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	Mild FRDA missense <sup>23</sup>
N146A	-	(Normal CplxIII interaction) <sup>22</sup>	Mild Desulfurase activation <sup>25</sup>
N146K	-	Mild <b>CplxIII</b> affinity <sup>25</sup>	Mild FRDA missense <sup>23</sup>
K147R	-	No <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	Mild Desulfurase activation <sup>25</sup>
Q148R	-	Reduced <b>CplxIII</b> affinity <sup>25</sup>	Ubiquitination <sup>26,27</sup>
Q148G	-	-	FRDA missense <sup>23</sup>
Q153A	-	Mild <b>CplxIII</b> affinity <sup>25</sup>	Low Desulfurase activation <sup>25</sup>
I154F	Iron-induced aggregat. <sup>24</sup>	Reduced <b>CplxIII</b> affinity <sup>28,25</sup>	Mild Desulfurase activation <sup>25</sup>
W155A	-	Reduced <b>CplxIII</b> affinity <sup>25</sup>	Low Desulfurase activation <sup>25</sup>
W155F	-	Mild <b>CplxIII</b> affinity <sup>25,28</sup>	FRDA missense <sup>23</sup> ; Well folded <sup>29</sup>
W155R	Iron-induced aggregat. <sup>24</sup>	Low <b>CplxIII</b> affinity <sup>28</sup>	Low Desulfurase activation <sup>25,28</sup>
L156P	-	No <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	Induced aggregation ( <i>42-210 isoform</i> ) <sup>30</sup>
R165C	-	Reduced <b>CplxIII</b> affinity <sup>25</sup>	Mild Desulfurase activation <sup>25</sup> !
R165P	-	-	Very low Desulfurase activation <sup>28</sup> !
W173G	-	No <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	Low Desulfurase activation <sup>28,25</sup>
L182F	-	Reduced <b>CplxIII</b> affinity <sup>28,25</sup>	Strong FRDA missense <sup>23</sup> ; Well folded <sup>29</sup>
L182H	-	Low <b>CplxIII</b> affinity <sup>28</sup>	Very low Desulfurase activation <sup>28,25</sup>
H183R	-	No <b>CplxIII</b> interaction <sup>22</sup>	FRDA missense <sup>23</sup>
L186R	-	-	FRDA missense <sup>23</sup>
L198R	-	-	FRDA missense <sup>23</sup>

NMR, X-Ray and HDX-MS in FXN	Iron interaction
H177 <sup>31</sup> (A114 ; D115 <sup>31</sup> ) (X-Ray)	Incubation with Fe <sup>2+</sup> and Fe <sup>3+</sup> salts
D112 ; L113 ; D115 ; V125 <sup>3,32</sup>   S126 <sup>32</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:1) (prot/iron ratio)
D112 ; L113 ; D115 <sup>33</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:1:2) (FXN/FECH!/Iron)
E108 <sup>3</sup>   D104 ; S105 ; D112 ; L113 ; A114 ; D115 ; T119 ; D122 ; D124 ; V125 <sup>20</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2)
D104 ; A114 ; D122 ; D124 <sup>3,32</sup>   A107 ; F110 ; T119 ; F120 <sup>3</sup>   F109 ; E111 <sup>32</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2) (Broadening)
D91 ; D104 ; D122 ; D112 ; L113 ; D115 <sup>20</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:3)
81-91 ; 91-98 ; 110-121 ; 122-127 <sup>20</sup> (HDX-MS)	Fe <sup>2+</sup> & Fe <sup>3+</sup> (1:2-3)
99-103 ; 128-132 ; 156-172 <sup>20</sup> (HDX-MS)	Fe <sup>3+</sup> (1:2-3)

Regions or residues of FXN	Additional features
S56-L78 <sup>34</sup>	Required for multimerisation
Y143 ; Y174 ; Y205 ; W155 <sup>35</sup>	Carbonylation and nitration modification
61-91 ; 81-91 <sup>32</sup> (RMN)	N-ter is unstructured and does not influence iron binding
195-210 <sup>36</sup> (RMN)	C-ter is required for protein stability

## Tableau 2 : Caractéristiques des résidus de la frataxine humaine (FXN)

Les références bibliographiques indiquées par des numéros en exposant sont réunies dans l'annexe 2.

pas suffisamment stable pour être visible en pull-down (Schmucker et al., 2011). Ainsi, l'interaction entre la Fxn et ISCU chez les orthologues mammifères supérieurs reste sujette à controverse. Très récemment cependant, de nouvelles expériences par cross-linking entre la frataxine et ISCU en présence de fer ont permis de confirmer l'existence possible d'une interaction directe (Watson et al., 2012). Ceci permet de supposer que dans les modèles mammifères, l'interaction entre ces deux partenaires est trop faible et transitoire et qu'elle nécessite donc des approches non conventionnelles pour être observée. L'implication du fer dans ce mécanisme semble également fondamental et soulève de nombreuses questions mécanistiques. Nous y reviendrons par la suite (Figure 26, Tableau 2).

Parallèlement à cela, des études ont été réalisées dans le modèle levure pour étayer les informations concernant l'interaction entre Yfh1 et Isu, les homologues levures de la frataxine et d'ISCU. Ceci a non seulement permis de confirmer l'importance du fer dans l'interaction directe Yfh1/Isu et également d'identifier précisément, notamment par RMN, la zone d'interaction d'Yfh1 avec Isu1 qui est localisée au niveau des feuillet  $\beta$  (Cook et al., 2010; Wang and Craig, 2008). L'importance des différents résidus de ce feuillet, notamment du tryptophane exposé, a été confirmée (Figure 26, Tableau 3) (Leidgens et al., 2010).

Il est important de noter qu'aucune interaction directe entre CyaY, l'homologue bactérien de la frataxine, et IscU n'a été proposée. Cependant, la zone d'interaction de CyaY avec IscU a quand même pu être étudiée par RMN, mais au sein du complexe IscS/IscU/CyaY (Figure 26, Tableau 4) (Prischi et al., 2010b).

### C. Autres interactions (machinerie ISC)

L'interaction directe entre CyaY et IscS a été caractérisée uniquement dans le modèle bactérien et nécessite la région chargée négativement (Adinolfi et al., 2009; Prischi et al., 2010b) (Figure 26, Tableau 4). Dans les modèles mammifères, l'interaction de la frataxine n'étant possible qu'au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU, ceci suggère qu'il existe vraisemblablement une zone d'interaction directe entre la frataxine et NFS1 (Tsai and Barondeau, 2010). Cependant, la nature même de cette interaction au sein d'un complexe nous empêche d'attribuer précisément quels résidus de la frataxine sont impliqués dans l'interaction directe avec NFS1 (Schmucker et al., 2011). Nous pouvons cependant le suggérer par analogie avec le modèle bactérien (Figure 26, Tableau 2). Rappelons que la mutation des résidus chargés positivement R220E et R223E sur IscS (Shi et al., 2010) et de leurs équivalents sur NFS1 (Stéphane Schmucker, données non publiées) abolit son interaction avec la frataxine. L'interaction directe entre la frataxine et la cystéine désulfurase, seule ou au sein d'un complexe, ne fait donc pas le moindre doute.

Des interactions directes entre la frataxine humaine et trois autres protéines de la voie de biosynthèse et de transfert des clusters FeS ont également été proposées. On retrouve ainsi (1) ISD11, la protéine associée à NFS1, (2) la chaperonne mitochondriale HSP70, homologue

Mutations in Yfh1	Iron interaction	Protein interaction	Additional features
Y73A	-	Iron-indep. trimerisation <sup>6-9</sup>	-
H74A	-	Iron-indep. trimerisation <sup>6</sup>	-
D78A	-	Iron-indep. trimerisation <sup>6</sup>	-
D78N/D82N/E89Q	-	-	Non-essential residues <sup>10</sup>
D79A	-	-	( <i>Ferroxidation site</i> ) <sup>11</sup>
D79A/D82A	-	No interact. with <b>Isu</b> & <b>Nfs1</b> ? <sup>8</sup>	( <i>Ferroxidation deficient</i> ) <sup>9</sup>
D79N/D86N/E90Q	-	-	Non-essential residues <sup>10</sup>
D82A	-	-	( <i>Ferroxidation site</i> ) <sup>11</sup>
D86K/E89K	-	Loss of interaction with <b>Isu</b> <sup>12</sup>	Low Aconitase activity <sup>12</sup>
D86A/E89A/D101A/E103A	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>12</sup>	Low Aconitase activity <sup>12</sup>
D86A/E90A/E93A	Lower Iron binding <sup>13</sup>	( <i>Not involved in Isu interact.</i> ) <sup>13</sup>	No iron-induced oligo. <sup>10,14</sup>
D86A/E90A/E93A/D101A/D103A	Lower Iron binding <sup>13</sup>	No interaction with <b>Isu</b> ? <sup>13</sup>	-
D86N/E90Q/E93Q	-	-	No iron-induced oligo. <sup>10</sup>
E89K	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>12</sup>	-
E90A	Lower Iron binding <sup>11</sup>	-	-
E93A	Lower Iron binding <sup>11</sup>	-	( <i>Mineralisation site</i> ) <sup>11</sup>
E93A/D97A/E103A	Lower Iron binding <sup>11</sup>	No interact. with <b>Isu</b> & <b>Nfs1</b> ? <sup>8</sup>	-
A94P	-	-	Low Aconitase activity <sup>15</sup>
D101A/E103A	Lower Iron binding <sup>13</sup>	No interaction with <b>Isu</b> ? <sup>13</sup>	-
D101K/E101K	-	-	Low Aconitase activity <sup>12</sup>
V108A/T110A	-	Iron-indep. trimerisation <sup>6</sup>	-
G107D	-	-	Low stability <sup>15</sup>
T118A/V120A	-	Iron-indep. trimerisation <sup>6,7</sup>	-
N122A	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>13</sup>	-
N122K	-	Reduced interact. with <b>Isu</b> <sup>13,14</sup> <b>Nfs1</b> and <b>Isd11</b> still retained <sup>14</sup>	-
N122A/K123T/Q124A	( <i>Can bind Iron</i> ) <sup>14</sup>	Reduced interact. with <b>Isu</b> <sup>13,14</sup> <b>Nfs1</b> and <b>Isd11</b> still retained <sup>14</sup>	( <i>Oligomerizes normally</i> ) <sup>14</sup>
K123T	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>13</sup>	-
Q124A	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>13</sup>	-
Q129A	-	Reduced interact. with <b>Isu</b> ? <sup>16</sup>	Low Aconitase activity <sup>16</sup>
I130A	-	-	Low Aconitase activity <sup>16</sup>
W131A	-	Reduced interaction with <b>Isu</b> <sup>16</sup>	Low Aconitase activity <sup>16</sup>
W131F	-	( <i>Normal interaction with Isu</i> ) <sup>16</sup>	Low Aconitase activity <sup>16</sup>
R141A	-	-	Low Aconitase activity <sup>16</sup>

NMR in Yfh1	Iron interaction
H83 ; D86 ; E93 ; A94 ; H95 ; D101 ; E103 ; L104 ; S105 ; N140 <sup>17</sup>    E75 ; E76 ; D78 ; L84 ; S87 ; L88 ; E89 ; E90 ; L91 ; S92 ; E93 ; A94 ; G107 ; K128 ; W131 ; E167 ; A169 ; K172 <sup>18</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2) (prot/iron ratio)
D79 ; D82 ; H83 ; L84 ; D86 ; E103 ; E112 ; T118 ; Q174 <sup>18</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2) (Broadening)

NMR in Yfh1	Protein interaction
H83 ; D86 ; L91 ; E93 ; H95 ; V102 ; E103 ; L104 ; S105 ; G107 ; T110 ; L111 ; Y119 ; V120 ; Q124 ; N127 ; N154 ; V166 ; I170 <sup>19</sup>	Fe-Yfh1-Isu (2-1-1)
( <i>Highly debated interaction. Details can be found in <sup>17</sup></i> )	Ferrochelatase

### Tableau 3 : Caractéristiques des résidus de la frataxine levure (Yfh1)

Les références bibliographiques indiquées par des numéros en exposant sont réunies dans l'annexe 2.

« fonctionnel » d'HscA (Shan et al., 2007), et enfin (3) la co-chaperonne HSC20, l'homologue d'HscB (Shan and Cortopassi, 2011). Ces interactions sont cependant très controversées.

Mutations in CyaY	Iron interaction	Protein interaction	Additional features
H7K/D76K	44% iron content <sup>1</sup>	-	Higher iron-induced aggregation <sup>1</sup> (Normal inhibition of IscS activity <sup>2</sup> )
E18K/E19K/D22K	18% iron content <sup>1</sup> Required for Fe <sup>2+</sup> fixation <sup>3</sup> Lower the Fe <sup>3+</sup> fixation <sup>3</sup>	Loss of interaction with <b>IscS</b> <sup>?4</sup>	Lower iron-induced aggregation <sup>1</sup>
E18A/E33S	19% iron content <sup>1</sup>	-	Lower iron-induced aggregation <sup>1</sup>
E19K/D22K	-	Loss of interaction with <b>IscS</b> <sup>?2</sup>	No inhibition of IscS activity <sup>2</sup>
D22K	-	Loss of interaction with <b>IscS</b> <sup>?2</sup>	No inhibition of IscS activity <sup>?2</sup>
D31K	-	Loss of interaction with <b>IscS</b> <sup>?2</sup>	No inhibition of IscS activity <sup>2</sup>
W61R	-	Partial interaction with <b>IscS</b> <sup>?2,4</sup>	Mild inhibition of IscS activity <sup>2</sup>

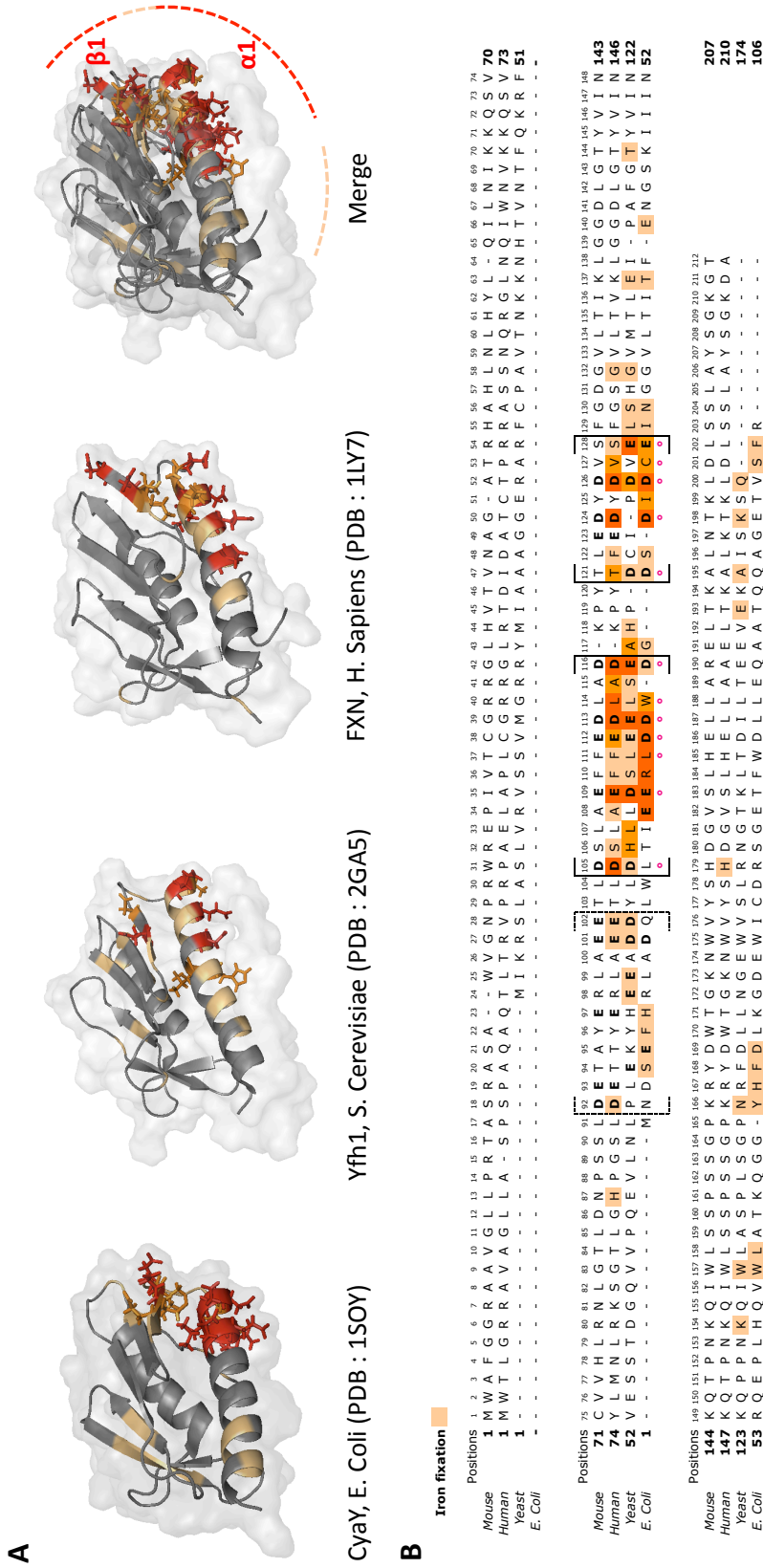
NMR in CyaY	Iron interaction
R20 ; L21 ; D22 ; D23 <sup>3,5</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:1) (prot/iron ratio)
E19 ; W24 ; D29 ; D31 ; C32 <sup>3</sup>   E19 ; E44 <sup>5</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2)
S4-H7 ; W61-L62 ; Y69-D72 <sup>3</sup>   W24 ; S28 ; D29 ; D31 ; C32 ; E33 <sup>5</sup>	Fe <sup>2+</sup> (1:2) (Broadening)
R20 ; D22 ; D23 <sup>3,5</sup>   L21 <sup>5</sup>	Fe <sup>3+</sup> (1:1)
D29 ; I30 ; D31 <sup>3,5</sup>	Fe <sup>3+</sup> (1:2)
L21 ; E33 ; I34 <sup>3</sup>	Fe <sup>3+</sup> (1:2) (Broadening)
E19-N35 ; T42 ; E44 ; S104 ; F105 <sup>5</sup>	Fe <sup>3+</sup> (1:6) (Broadening)

NMR in CyaY	Protein interaction
D22 ; D23 ; S28 ; D29 ; E33 ; I34 ; F43 ; E44 <sup>2</sup>	CyaY-IscS (1:0.5) (protein ratio)
L21 ; N35 ; L39 ; T42 ; G46 ; K48 ; T64 ; Q98 <sup>2</sup>	CyaY-IscS (1:0.75)
W14 ; L15 ; E19 ; D22 ; D23 ; W24 ; D25 ; D27 ; S28 ; D29 ; I30 ; D31 ; C32 ; E33 ; I34 ; L39 ; T42 ; F43 ; E44 ; G46 <sup>4</sup>	CyaY-IscS (1:1)
W14 ; E19 ; D22 ; D23 ; W24 ; D27 ; S28 ; D29 ; I30 ; D31 ; E33 ; I34 ; L39 ; F43 ; E44 <sup>4</sup>	CyaY-IscS-IscU (1:1:1)
W40 ; I41 ; K48 ; I50 ; N52 ; R53 ; E55 ; W61 ; L62 ; A63 ; T64 ; Q66 ; G68 ; Y69 ; H70 <sup>4</sup>	CyaY-IscS-IscU (1:1:1) (IscU only)

**Tableau 4 :** Caractéristiques des résidus de la frataxine bactérienne (CyaY)

Les références bibliographiques indiquées par des numéros en exposant sont réunies dans l'annexe 2.





**Figure 27 :** Résidus de la frataxine impliqués dans l'interaction avec le fer

(A) Représentation des résidus impliqués dans ces interactions sur les structures bactérienne, levure et humaine de la frataxine. (B) Représentation des résidus impliqués dans ces interactions sur un alignement multiple comprenant les frataxines bactérienne, levure, humaine et souris. Un dégradé de rouge est utilisé pour illustrer les probabilités d'implication des résidus dans l'interaction avec le fer : les résidus les plus fréquemment démontrés comme coordonnés du fer sont en rouge plus foncé. Ces informations sont toutes issues des tableaux 1, 2 et 3.

## II.2.2. Interaction de la frataxine avec le fer

### A. Le fer et la frataxine mammifère

L'étude de l'interaction entre la frataxine et le fer a entraîné un très grand nombre de publications contradictoires. La fixation du fer par la frataxine humaine a été observée pour la première fois par incubation des cristaux de celle-ci avec du fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) ou ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ). Les mesures ont montré la fixation d'environ un atome de fer par frataxine, sur l'histidine-177, un résidu non conservé (Dhe-Paganon et al., 2000). Parallèlement, une première étude structurale par RMN a suggéré que la frataxine humaine ne fixait pas de fer, ni sous sa forme  $\text{Fe}^{2+}$ , ni sous la forme  $\text{Fe}^{3+}$  (Musco et al., 2000). Cette étude est aujourd'hui mise à mal par les récentes analyses par RMN de la fixation du  $\text{Fe}^{2+}$  (Gentry et al., 2013; Prischi et al., 2009) qui proposent la présence de deux sites de fixation du fer (Figure 27, Tableau 2).

Parallèlement à cela, une première étude par ITC avait suggéré la fixation de six à sept atomes de fer sur la frataxine humaine avec une affinité faible de  $11.7 \mu\text{M}$  pour le  $\text{Fe}^{3+}$  et une affinité extrêmement réduite de  $55 \mu\text{M}$  pour le  $\text{Fe}^{2+}$  (Yoon and Cowan, 2003). Des études complémentaires suggèrent quant à elles une affinité du  $\text{Fe}^{3+}$  pour la frataxine de  $13$  à  $36 \mu\text{M}$  (Correia et al., 2009) et de  $460 \mu\text{M}$  pour le  $\text{Fe}^{2+}$  (Huang et al., 2008). Si l'on peut supposer qu'une protéine potentiellement impliquée dans le transport et/ou le don de fer ne doit pas avoir une affinité trop grande pour ce métal afin de pouvoir le relarguer facilement, ces affinités extrêmement réduites *in vitro* questionnent sérieusement quant à leurs réalités *in vivo*.

### B. Le fer et la frataxine levure

La première étude sur la frataxine levure par EXAFS a suggéré la fixation de deux atomes de fer sous la forme  $\text{Fe}^{2+}$  avec une affinité de  $2$  à  $3 \mu\text{M}$  (Cook et al., 2006). Par la suite, des données par ITC ont été publiées par le même groupe, proposant une affinité de  $1.64 \mu\text{M}$  pour le premier site  $\text{Fe}^{2+}$ , et de  $113 \mu\text{M}$  pour le second (Cook et al., 2010). La zone de fixation du  $\text{Fe}^{2+}$  sur Yfh1 a été caractérisée par RMN (Cook et al., 2006; He et al., 2004) ainsi que par l'intermédiaire de mutations ponctuelles (Foury et al., 2007) qui démontrent que, comme pour la frataxine humaine, Yfh1 coordonne préférentiellement le fer par l'intermédiaire de son arête chargée négativement (Figure 27, Tableau 3).

Il est cependant important de remarquer que la fixation du fer sur la frataxine levure n'est pas exclusivement dépendante des résidus chargés négativement. En effet, même en mutant plusieurs d'entre eux, on garde toujours au moins deux  $\text{Fe}^{2+}$  par monomère (Correia et al., 2010) ce qui suggère que la spécificité de fixation est très réduite.



## C. Le fer et la frataxine bactérienne

Les premières analyses spectroscopiques de CyaY, la frataxine bactérienne, ont rapidement permis de réaliser que cet homologue, comme les autres, ne semble pas fixer le fer avec une grande affinité (Cho et al., 2000). De précieuses études par RMN ont été réalisées sur CyaY et ont permis d'identifier les sites de fixation du fer (Nair et al., 2004; Pastore et al., 2007). Comme pour les autres homologues de la frataxine, CyaY utilise son arête chargée négativement pour fixer le fer. Sur CyaY, au moins 2  $\text{Fe}^{2+}$  se fixent avec une affinité de 4  $\mu\text{M}$ . Remarquons également qu'en présence d'excès de  $\text{Fe}^{3+}$ , de 25 à 26  $\text{Fe}^{3+}$  peuvent se fixer sur CyaY suggérant un mécanisme de fixation aspécifique (Bou-Abdallah et al., 2004) (Figure 27, Tableau 4).

La fixation d'autres métaux sur CyaY a été analysée et montre que la sélectivité pour le fer est en réalité faible. Par ailleurs, les sites de fixation du fer de CyaY sont composés exclusivement de résidus aspartate et glutamate, ce qui est très inhabituel. En effet, on observe généralement la présence d'une poche et/ou de résidus histidine. Globalement, la fixation du fer, même sur CyaY ne semble pas convaincante (Pastore et al., 2007), en tous cas d'un point de vue physiologique.

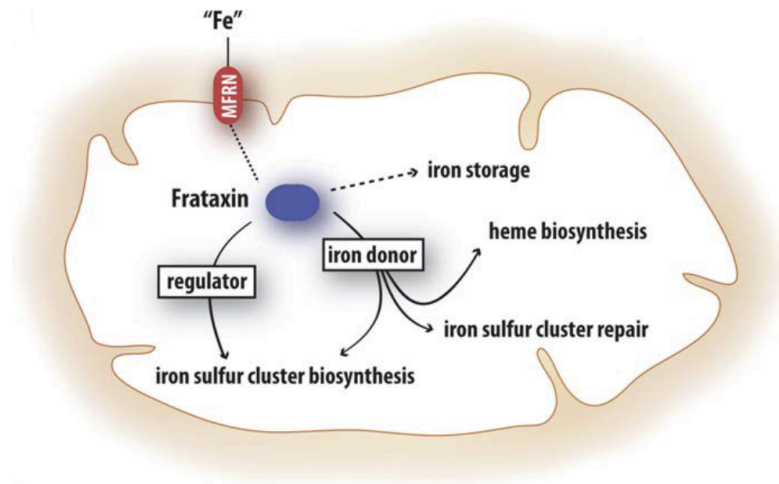
### II.2.3. Autres partenaires protéiques potentiels

#### A. La ferrochélatase

La ferrochélatase est une protéine FeS mitochondriale qui assure la dernière étape de la biosynthèse de l'hème. L'implication potentielle de la frataxine dans cette voie de biosynthèse a été initialement suggérée par l'observation d'une diminution du contenu en hème dans des cellules ou des levures déficientes en frataxine (Lesuisse et al., 2003). Si différentes méthodes biophysiques ont été utilisées pour caractériser l'interaction frataxine-ferrochélatase, notamment par Bioacore (Lesuisse et al., 2003), RMN (Bencze et al., 2007; He et al., 2004) ou ITC (Yoon and Cowan, 2004), aucune confirmation de l'interaction par GST-pulldown ou immunoprécipitation n'a jamais été réalisée. A ce jour, cette interaction est considérée comme artéfactuelle, pour ne pas dire inexacte, par la communauté scientifique.

#### B. L'aconitase mitochondriale

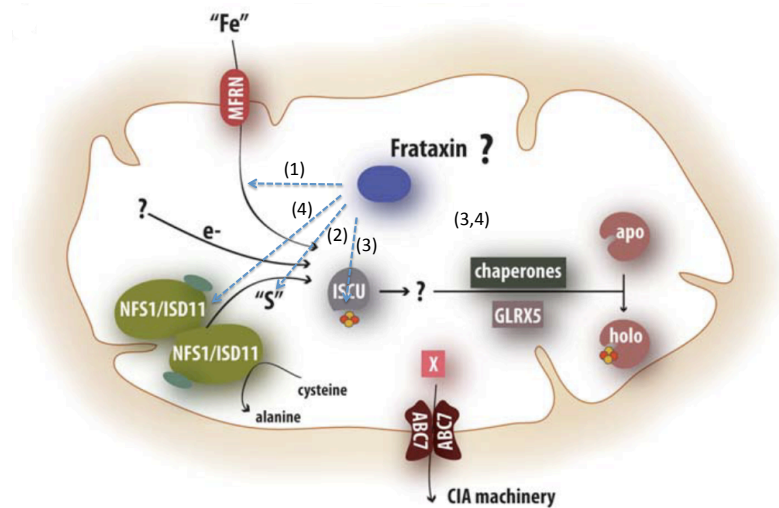
L'aconitase mitochondriale est une protéine FeS membre du cycle de Krebs, dont le rôle est de convertir le citrate en isocitrate par un mécanisme d'isomérisation. Une interaction entre l'aconitase mitochondriale et la frataxine a été proposée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation sur des mitochondries isolées de levure ou de rat (Bulteau et al., 2004). Cette interaction n'a pu être observée qu'en présence de citrate et de peroxyde d'hydrogène, c'est-à-dire dans des conditions où le cluster  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  de l'aconitase est partiellement dégradé. Ceci a alors permis de suggérer plutôt un rôle de protection, de stabilisation voire de



**Figure 28 : Rôles proposés de la frataxine**

La frataxine est une petite protéine mitochondriale capable de fixer du fer *in vitro*. Les différents rôles proposés pour la frataxine sont : le stockage de fer, l’apport de fer pour la biosynthèse de l’hème et des clusters FeS et enfin, la régulation de la biosynthèse des clusters FeS.

(Schmucker et Puccio, 2010)



**Figure 29 : Rôle de la frataxine dans la machinerie ISC**

Schéma simplifié de la machinerie ISC mammifère. La frataxine a été proposée comme donneur de fer (1), régulateur de l’activité cystéine désulfurase de NFS1/ISD11 (2), régulateur de la production des clusters FeS (3) ou stabilisateur du complexe NFS1/ISD11/ISCU (4).

(Adaptée de Schmucker & Puccio, 2010)

réparation des clusters FeS endommagés. Cependant, cette expérience n'a jamais pu être reproduite, ni dans des conditions plus physiologiques, ni même dans celles exposées dans la publication. Comme pour l'interaction frataxine/ferrochélatase, l'interaction frataxine/aconitase est aujourd'hui considérée comme inexacte.

### **C. Les protéines de la chaîne respiratoire**

La frataxine a également été proposée comme interagissant avec deux sous-unités du complexe II de la chaîne respiratoire, SDH1 et SDH2 (Succinate Deshydrogénase), ainsi qu'avec deux sous-unités du complexe flavoprotéine, ETFa et ETFb (Electron Transfert Flavoprotein) (Gonzalez-Cabo et al., 2005). Cependant aucune autre étude décrivant ces interactions n'a été publiée, ce qui limite leur portée.

## **II.3. Rôle de la frataxine**

La fonction de la frataxine est sujette à controverse (Figure 28). Cependant, une lecture adéquate du rôle de la frataxine implique probablement plus une combinaison des observations faites dans les différents modèles *in vivo* et systèmes *in vitro* qu'une confrontation de ceux-ci. Les différences que nous observons ne sont pas nécessairement de réelles variations fonctionnelles. La très haute conservation de séquence de la frataxine et les différentes expériences de remplacements fonctionnels réussies par des orthologues dans les modèles levures *in vivo* vont dans ce sens (Bedekovics et al., 2007; Busi et al., 2004; Kondapalli et al., 2008).

Nous avons regroupé les différentes hypothèses ici en privilégiant dans un premier temps les hypothèses de son rôle dans la biosynthèse des clusters FeS (Figure 29), puis celles dans le stockage/transport du fer, et enfin celles suggérant son implication dans le mécanisme de défense contre le stress oxydant.

### **II.3.1. Fonction dans la production des centres FeS**

#### **A. Observations *in vivo***

Très tôt l'observation d'un déficit en activité de l'aconitase mitochondriale dans le modèle levure et chez les patients atteints de l'ataxie de Friedreich a suggéré un rôle de la frataxine dans la régulation de la biosynthèse des clusters FeS (Foury, 1999; Rötig et al., 1997). Ce rôle, initialement présenté comme non-essentiel (Duby et al., 2002), a cependant rapidement été considéré comme la fonction primaire de la frataxine (Mühlenhoff et al., 2002). La démonstration de son implication dans la première étape du mécanisme de biosynthèse des clusters FeS, et non dans leur transfert, a été faite dans le modèle levure et les modèles souris (Mühlenhoff et al., 2003; Puccio et al., 2001). En effet, l'absence de frataxine conduit à un déficit de fixation du fer, *a priori* sous forme de clusters FeS, sur Isu. Ceci



distingue d'ailleurs la frataxine de ses deux partenaires phylogénétiques Ssq1 (HscA/mtHSP70) et Jac1 (HscB/Hsc20) (Huynen et al., 2001) dont la délétion a un effet inverse, c'est-à-dire une accumulation de fer sur Isu (Mühlenhoff et al., 2003). L'utilisation d'une approche par ARNi dans des cellules humaines a par ailleurs confirmé que la frataxine est impliquée dans la régulation de la production des clusters FeS et de la maturation des protéines FeS mitochondriales et cytosoliques (Stehling et al., 2004), constat qui fait l'unanimité aujourd'hui (Martelli et al., 2007, 2012). Cette étude a par ailleurs permis de confirmer que l'accumulation de fer dont nous parlerons dans le chapitre suivant n'est qu'un effet secondaire. Ces observations ont déjà été faites dans différents modèles souris (Puccio et al., 2001) avec une délétion conditionnelle tissu-spécifique de la frataxine (voir revue (Perdomini et al., 2013)).

Parallèlement à cela, différentes mutations ont été faites sur Yfh1, l'homologue levure de la frataxine. Ceci a permis de faire la démonstration d'une interaction directe entre la frataxine (Yfh1) et la protéine d'échafaudage (Isu) *in vivo* (Ramazzotti et al., 2004), et d'une implication directe ou indirecte des résidus de l'arête chargée négativement et du feuillet  $\beta$  dans le processus de formation des clusters FeS (Foury et al., 2007; Wang and Craig, 2008).

## **B. Observations *in vitro***

Les expériences faites *in vitro* ont permis de faire différentes hypothèses plus mécanistiques sur le rôle de la frataxine dans le mécanisme de biosynthèse des clusters FeS. Partant du constat qu'il existe une affinité de la frataxine pour le fer, même si elle est très faible, la première d'entre-elle a été un rôle de donneur de fer. Cette hypothèse a été supportée par les observations faites avec la frataxine humaine (Yoon and Cowan, 2003), où son implication dans la formation de clusters [2Fe-2S] sur ISCU a été proposée. Cette observation a été confirmée par spectroscopie plus tard dans le système bactérien où une forme oligomérique de CyaY (frataxine bactérienne) chargée par du  $\text{Fe}^{3+}$  a permis la formation de clusters [2Fe-2S] sur IscU, en utilisant la cystéine désulfurase IscS comme source de soufre (Ai et al., 2011; Layer et al., 2006). Cette hypothèse est cependant contestée dans la mesure où l'étude cinétique de formation des clusters [2Fe-2S] *in vitro* semble être inhibée en présence de frataxine. Ce mécanisme, dépendant du fer, donne un rôle de régulateur ou de « gardien » de la biosynthèse de clusters à la frataxine (Adinolfi et al., 2009).

Ceci a conduit à une seconde hypothèse, celle de l'implication de la frataxine comme régulateur de l'activité enzymatique de la cystéine désulfurase (IscS/NFS1). Cependant les études réalisées dans les modèles bactériens et mammifères sont contradictoires : dans le cas des protéines bactériennes (Iannuzzi et al., 2011), CyaY se comporte comme un inhibiteur de l'activité d'IscS alors que dans le cas des protéines mammifères, la FXN est un activateur de l'activité d'NFS1 (Bridwell-Rabb et al., 2011; Tsai and Barondeau, 2010; Tsai et al., 2011). Cette observation biologiquement surprenante du point de vue évolutif, car elle laisse penser que les frataxines procaryotes et eucaryotes auraient des rôles opposés, doit cependant être





mise en perspective. En effet, la co-expression *in vitro* des protéines procaryotes et eucaryotes a permis de constater que l'effet activation/inhibition tient plus de l'activité de base des désulfurases IscS et NFS1/ISD11, puisque la première est extrêmement active et la seconde quasiment pas (Bridwell-Rabb et al., 2012). Il apparaît donc que la frataxine, si elle a véritablement un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique de la cystéine désulfurase, est plutôt un modulateur.

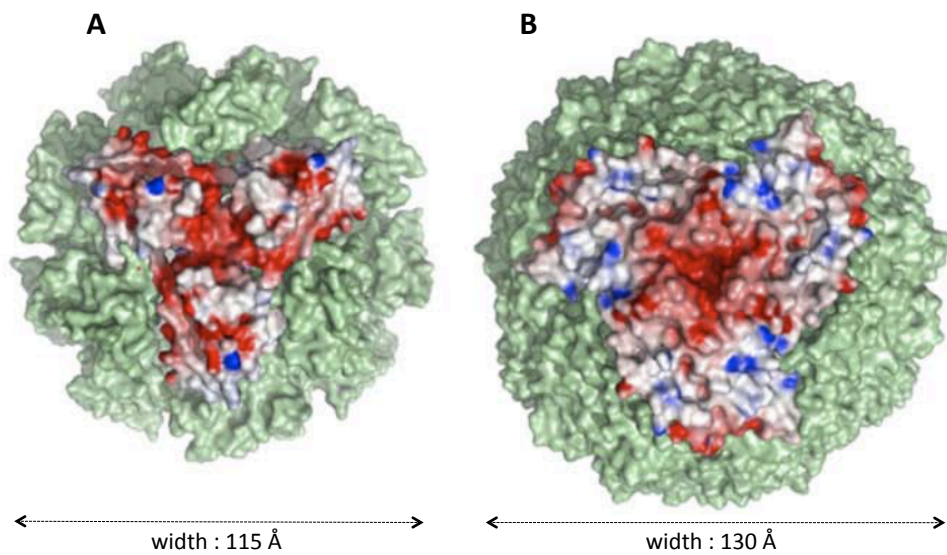
Quel que soit son rôle exact dans la biosynthèse des clusters FeS, et parallèlement aux observations faites sur l'activité enzymatique de la désulfurase, la frataxine est décrite comme un activateur (Tsai and Barondeau, 2010) ou un inhibiteur de la formation des clusters FeS (Iannuzzi et al., 2011). S'il a été initialement suggéré dans le modèle bactérien que CyaY était un inhibiteur spécifique de la formation des clusters [2Fe-2S] (Adinolfi et al., 2009), il apparaît aujourd'hui qu'elle le soit indifféremment pour les deux types de clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (Iannuzzi et al., 2011). Nous reviendrons en détails dans notre discussion sur ces différents aspects qui sont de première importance dans le cadre de nos travaux.

### **II.3.2. Fonction dans le stockage/transport du fer ?**

#### **A. Observations *in vivo***

Dès 1980, la caractérisation de biopsies cardiaques de patients atteints de l'ataxie de Friedreich a révélé la présence de dépôts de fer (Lamarche et al., 1980). L'hypothèse de l'implication de la frataxine dans le métabolisme du fer a été confirmée dans le modèle levure (Babcock et al., 1997). Une fonction dans l'efflux du fer de la mitochondrie vers le cytosol a également été proposée, puisque la réintroduction de frataxine active la sortie du fer accumulé dans les mitochondries chez la levure (Radisky et al., 1999). Cependant, les levures présentent une accumulation du fer bien moindre dans les délétions inductibles, suggérant qu'il s'agit d'un effet secondaire et non primaire (Mühlenhoff et al., 2002), hypothèse confirmée depuis dans les modèles murins conditionnels à délétion tissu-spécifique de la frataxine (Puccio et al., 2001) (voir revue (Martelli et al., 2012)).

Par ailleurs, la frataxine levure a été observée sous deux formes, l'une monomérique, l'autre multimérique, formant des complexes de plus de 600 kDa qui pourraient être impliqués dans le stockage du fer (Adamec et al., 2000). Cette hypothèse qui est très largement étudiée *in vitro* est cependant mise à mal par l'utilisation d'un mutant de la frataxine levure incapable d'oligomériser (Aloria et al., 2004), et pourtant parfaitement fonctionnel *in vivo*, du moins dans leurs conditions expérimentales. Ceci suggère que le mécanisme d'oligomérisation et de stockage du fer n'est pas essentiel. Des essais ont même été réalisés avec d'importants excès de fer et des niveaux bas d'expression de frataxine, mais n'ont pas été concluants (Aloria et al., 2004). Une étude plus récente semble appuyer cette hypothèse puisque la présence ou l'absence de Yfh1 dans le modèle levure n'a aucune conséquence sur la distribution du fer dans les cellules (Seguin et al., 2010).



**Figure 30: Comparaison des oligomères de frataxines et de ferritines**

Similarités structurales entre le modèle d'oligomère de frataxine levure (A) et celui de la ferritine mammifère (B). Les surfaces sont représentées en vert. Les deux complexes sont formés par 8 sous-unités trimériques et forment des 24-mères. Les potentiels électrostatiques de surface sont représentés par un dégradé bleu/rouge<sup>+</sup> sur une sous-unité trimérique de frataxines et de ferritines.

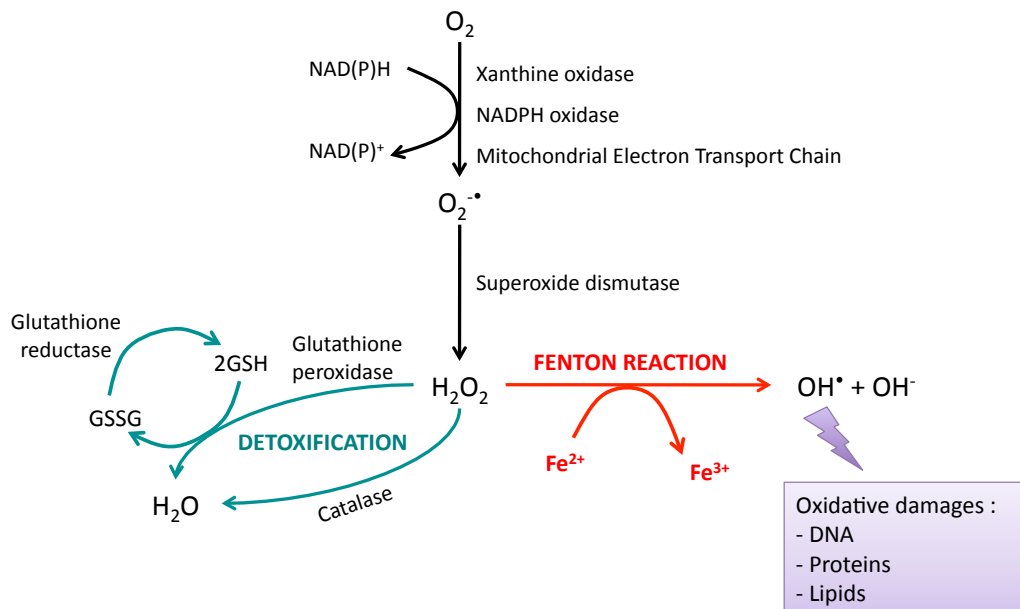
*(Issue de Karlberg et al, 2006)*

## B. Observations *in vitro*

Outre les nombreuses études qui portent sur la fixation du fer sur la frataxine et dont nous avons précédemment parlé, l'existence d'oligomères capables de stocker du fer a été démontrée *in vitro*. Si des études sur CyaY et la FXN suggèrent que ces oligomères sont plutôt des agrégats solubles (Adinolfi et al., 2004b), des études structurales sur la frataxine levure Yfh1 montrent l'existence d'un véritable oligomère sphérique. Il est cependant important de rappeler à titre introductif que les études réalisées en l'absence de fer ont systématiquement été faites avec le mutant Y73A.

Si la frataxine humaine a originellement été proposée comme incapable d'oligomériser (Musco et al., 2000), il n'en a pas été de même avec la frataxine levure Yfh1 qui en présence de Fe<sup>2+</sup> forme des trimères voir des « méga-complexes » de plus d'un 1MDa contenant environ 3000 atomes de fer. L'analyse par RPE (résonance paramagnétique nucléaire) avait alors permis de conclure que 60% du fer était sous forme ferrique. L'hypothèse d'un mécanisme de ferroxidation pour la frataxine et donc un éventuel rôle ferritine-like a alors été émise (Figure 30) (Adamec et al., 2000). Des études complémentaires, notamment par DLS (dynamic light scattering), avaient permis d'affiner l'estimation de la taille de l'oligomère d'Yfh1 : celui-ci ferait donc 600 à 840 kDa (Cavadini et al., 2002). Il serait formé par un mécanisme d'assemblage rapide par près de 48 frataxines et contiendrait 2400 atomes de fer (Gakh et al., 2002). Le mécanisme de ferroxidation et l'implication directe de la frataxine dans ce mécanisme ont été étudiés *in vitro* (Park et al., 2002, 2003) et restent controversés. Par la suite, les structures des trimères de frataxines (Y73A) levures, avec et sans fer, ont été obtenues par cristallisation et résolution par rayons-X (Karlberg et al., 2006). La structure complète des oligomères a été proposée à partir d'informations de microscopie électronique : 8 trimères seraient nécessaires pour former une super-structure de 24 frataxines. Les différentes conformations structurales ont permis de proposer un modèle de détoxification et de don du fer (Karlberg et al., 2006). Enfin, la structure en oligomère complet (Y73A) levure a été établie par microscopie électronique à une excellente résolution de 13Å. Le docking de la structure trimérique de la frataxine a été réalisé sur les résultats de microscopie électronique et suggère un arrangement différent de celui des ferritines et une accessibilité du site proposé pour la ferroxidation (Figure 30) (Schagerlöf et al., 2008). La formation du méga-complexe a plus récemment été montrée comme promue par d'autres métaux divalents, ainsi que le glycérol (Söderberg et al., 2011), démontrant que ce mécanisme n'est pas lié au fer.

Parallèlement, l'étude de l'oligomérisation de CyaY et de la FXN humaine a permis de conclure que la formation d'agrégats de frataxine induits par le fer est observée chez l'homologue bactérien, mais *a priori* pas chez l'humain (Adinolfi et al., 2002). Cependant, en condition physiologique, ces agrégats ne semblent pas pouvoir exister. Par ailleurs, le processus nécessite le domaine chargé négativement de la frataxine, puisque des mutations dans ce domaine rendent CyaY incapable d'oligomériser (Adinolfi et al., 2002). L'oligomérisation de la frataxine humaine a finalement été observée en 2005, mais celle-ci



**Figure 31 : Métabolisme des ROS**

Production de peroxyde d'hydrogène (flèches noires) et sa conversion en espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la réaction de Fenton (flèches rouge) ou sa détoxification enzymatique (flèches vertes).

(Adaptée de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6370/>)

nécessite la présence de la région 42-81 N-terminale non conservée (O'Neill et al., 2005a). Rappelons que ce domaine de la frataxine n'est pas essentiel *in vivo* (Schmucker et al., 2011). Des études réalisées *in vivo* ont permis cependant de suggérer des variations dans les proportions entre l'isoforme 42-210 et l'isoforme 81-210 de la frataxine humaine chez les patients Friedreich (Gakh et al., 2010).

Il apparaît donc évident que si l'existence d'oligomères de frataxine ne fait aucun doute *in vitro*, leur rôle *in vivo* est plus que questionnable. Si on ne peut exclure la possibilité que dans certaines conditions physiologiques précises la frataxine sous forme oligomère ait un rôle essentiel, il reste à démontrer.

### **II.3.3. Fonction dans la protection contre le stress oxydant ?**

#### **A. Observations *in vivo***

Un déficit fonctionnel de l'aconitase et des protéines à clusters FeS de la chaîne respiratoire a été observé et a initialement été attribué à la présence d'espèce réactives oxygénées produites par la réaction de Fenton (Figure 31) au niveau des mitochondries, où le fer s'accumule (Rötig et al., 1997). De manière intéressante, il a été montré chez la levure déficiente en frataxine qu'une réduction de l'accumulation de fer par l'utilisation de chélateurs restaurait les fonctions des protéines de la chaîne respiratoire, mais pas celles de l'aconitase cytosolique. Ceci suggère que l'accumulation de fer participe peut-être à la détérioration des clusters FeS, mais n'est pas nécessairement la raison primaire du déficit fonctionnel des protéines FeS (Foury, 1999). Le rôle exacte de la frataxine est cependant plus complexe, puisque sa délétion complète dans le modèle bactérien n'entraîne aucune conséquence sur la survie, même en présence d'espèces oxydantes (Li et al., 1999).

Deux études ont montrées que les patients atteints de l'ataxie de Friedreich présentaient une élévation de marqueurs du stress oxydatif dans le plasma et dans les urines tels que le malondialdéhyde (Emond et al., 2000) et la 8-OH-2'-deoxyguanosine (Schulz et al., 2000). Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés depuis. Chez les modèles mammifères, un rôle d'antioxydant a été proposé dans le cas de cellules sur-exprimant la frataxine, puisqu'on observe un niveau élevé de glutathion peroxydase (Shoichet et al., 2002). Par ailleurs, des mutations de la frataxine levure permettent d'empêcher l'activité peroxydase des oligomères de frataxine dont nous avons parlé précédemment. Les mutants montrent une sensibilité accrue au stress oxydant et suggèrent un rôle de la frataxine dans ce processus (Gakh et al., 2006).

#### **B. Observations *in vitro***

Complètement liée aux études sur les oligomères et sur la capacité proposée de ferroydation de la frataxine, l'hypothèse que les conséquences délétères de la réaction d'oxydation du Fe<sup>2+</sup> par l'oxygène, initiant la réaction de Fenton, puissent être diminuées par



la présence de la frataxine a été avancée par l'équipe de Grazzia Isaya et confirmée expérimentalement plus tard (Bou-Abdallah et al., 2004). En effet, la quantité d'espèces réactives oxydantes semble être produite de manière cinétiquement réduite en présence de frataxine. Dans le cas de la frataxine humaine, cette activité a été observée au sein des oligomères (O'Neill et al., 2005b). Par ailleurs, en condition de stress oxydant, CyaY acquiert la capacité de fixer du fer, suggérant que cette dernière participe à la détoxification du Fe<sup>2+</sup> réactif (Ding et al., 2007). Cet aspect est cependant très controversé.

### **III - L'Ataxie de Friedreich**

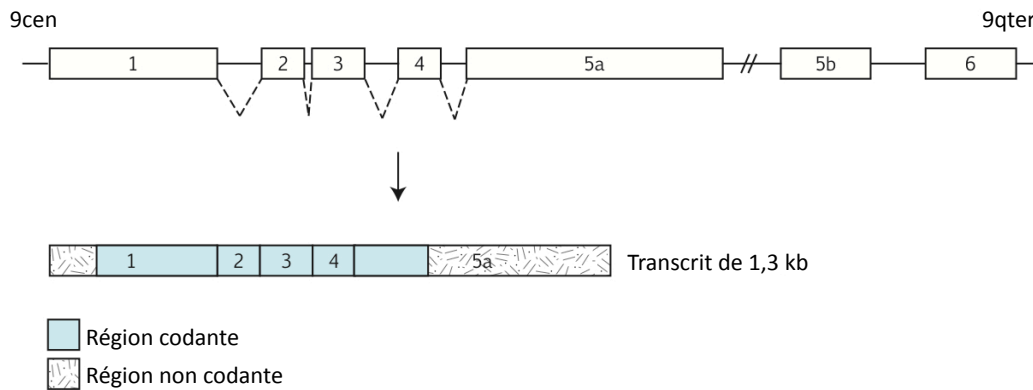
#### **III.1. Epidémiologie**

L'ataxie de Friedreich (AF) est la plus fréquente des ataxies récessives avec une incidence à la naissance de 1/30 000 et une prévalence de 1/50 000 dans les populations caucasiennes (Cossée et al., 1997). Ceci représente statistiquement environ 1300 personnes atteintes en France. La maladie est observée dans les populations d'Europe, d'Afrique du nord, du Moyen-Orient et d'Inde, et est issue d'un effet fondateur probablement antérieur à la séparation géographique de ces populations (Cossée et al., 1997; Labuda et al., 2000). De ce fait, la maladie est rare, sinon absente, dans les populations d'Afrique sub-saharienne, Amérindiennes et Est Asiatiques (Cossée et al., 1997; Labuda et al., 2000).

#### **III.2. Signes cliniques**

L'AF est une maladie neurodégénérative dans laquelle on observe un panel de symptômes neurologiques. L'AF est également très fréquemment associée à des symptômes non neurologiques. Les premiers symptômes apparaissent généralement avant l'âge de 25 ans. L'ataxie à proprement parler, qui se manifeste par des troubles de la marche, une instabilité en position debout ainsi qu'une maladresse accrue, constitue souvent le premier signe de la maladie. Le tableau clinique de l'AF se complète dans les 5 à 10 ans suivant l'apparition des premiers symptômes, avec notamment l'apparition de difficultés d'élocution, l'abolition des réflexes ostéotendineux, et la perte de la sensibilité profonde au niveau des membres inférieurs (Harding, 1981). D'autres symptômes peuvent s'y ajouter, tels qu'une cardiomyopathie et une scoliose, et plus rarement un diabète (Harding, 1981). Les patients perdent généralement leur activité locomotrice dans les 10-15 ans qui suivent le début de la maladie (Harding, 1981; De Michele et al., 1996). Progressivement ils ont de plus en plus besoin d'assistance pour les gestes du quotidien car ils ont du mal à écrire, se laver, s'habiller ou encore à utiliser des couverts pour se nourrir.

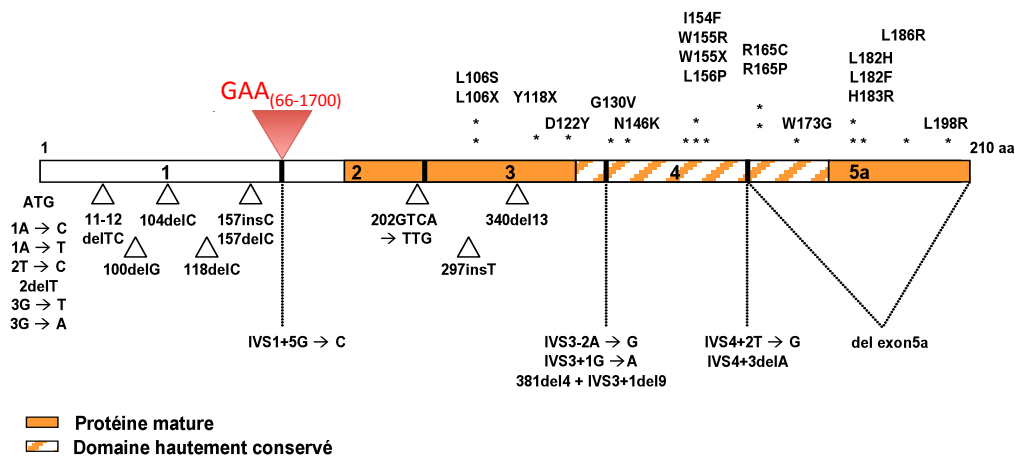




**Figure 32 : Structure du gène *FXN* humain**

Les sept exons qui composent le gène *FXN* s'étendent sur 85kb. Sa transcription se matérialise par un ARNm majoritaire de 1,3 kb correspondant aux exons 1 à 5a. Les échelles ne sont pas respectées. *Cent* : centromère, *qter* : extrémité du bras long, traits en pointillés : épissage.

(Figure fournie par A. HICK)



**Figure 33 : Répartition des mutations sur la frataxine**

L'expansion de triplets GAA située dans le premier intron du gène est matérialisée par un triangle rouge. Les étoiles localisent les mutations faux-sens et non-sens situées dans la forme mature de la frataxine ( $FXN_{81-210}$ ). Les petits triangles blancs indiquent les délétions et les insertions. Les traits pointillés au niveau des transitions d'exons, matérialisent les mutations au niveau des sites introniques d'épissage.

(Issue de la thèse de N. Carelle-Calmels)

### III.3. Aspects moléculaires

#### III.3.1. Structure et expression du gène *FXN*

Le gène muté dans la maladie a été identifié en 1996 par l'équipe du Professeur Michel Koenig (Campuzano et al., 1996). Il s'agit du gène *FXN*, qui se situe sur le chromosome 9 et comporte 7 exons qui s'étendent sur plus de 85 kb (Figure 32). Les exons 1 à 5a sont transcrits en un ARNm de 1,3 kb codant pour la frataxine. Un deuxième transcrit de 1,8 kb, incluant l'exon alternatif 5b a été rapporté, mais son existence est aujourd'hui considérée comme anecdotique (Campuzano et al., 1996; Cossée et al., 1997).

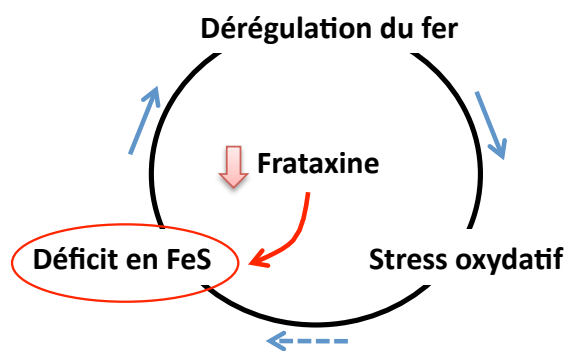
La frataxine est une protéine ubiquitaire et son niveau d'expression corrèle partiellement avec les organes affectés par la maladie. En effet, elle est fortement exprimée dans le cœur et la moelle épinière, modérément dans le pancréas, le foie, le muscle squelettique et le cervelet, et faiblement dans d'autres tissus, tels que le cortex cérébral (Campuzano et al., 1996, 1997).

#### III.3.2. Les mutations du gène *FXN*

Le diagnostic moléculaire de larges cohortes de patients AF a permis d'identifier que 96% des patients étaient homozygotes pour une expansion de trinuécléotides (GAA) dans le premier intron du gène *FXN*. Les 4% restant sont hétérozygotes composites (De Castro et al., 2000; Cossée et al., 1999) : ils possèdent une expansion de triplets (GAA) sur un allèle et une autre mutation sur le second allèle, située dans la séquence codante ou au niveau de sites introniques d'épissage (Figure 33).

Dans la population générale, les allèles normaux comportent de 5 à 36 répétitions GAA (Cossée et al., 1997; Montermini et al., 1997). La taille des expansions trouvées chez les patients AF varie de 66 à 1700 répétitions, avec une majorité de patients ayant plutôt des expansions comptant de 600 à 900 répétitions GAA. Les patients homozygotes pour l'expansion (GAA)<sub>n</sub> ont un taux résiduel de frataxine de l'ordre de 5-30%, dû à une diminution de la transcription du gène *FXN* (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998). Une corrélation négative entre la taille de la plus petite expansion (GAA)<sub>n</sub> et l'âge d'apparition des symptômes d'une part, et la vitesse de progression de la maladie d'autre part, ont pu être établies (Dürr et al., 1996).

En dehors de l'expansion GAA, une quarantaine d'autres mutations ont été identifiées chez les patients AF : elles ont pour effet d'entraîner un faux-sens, un non-sens, un décalage du cadre de lecture, une erreur d'épissage et parfois une délétion d'exons. Les patients hétérozygotes composites ont généralement un tableau clinique comparable à celui des patients homozygotes pour l'expansion (GAA).



**Figure 34 : Physiopathologie associée à l'ataxie de Friedreich**

L'analyse d'échantillons provenant de patients atteints par l'ataxie de Friedreich a révélé un déficit d'activité d'enzymes Fe-S (aconitase, complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale), des dépôts de fer et des marques de stress oxydatif. La caractérisation des modèles murins où la frataxine est spécifiquement délétée dans certains tissus a permis de montrer que le manque de frataxine induisait d'abord un déficit en protéines FeS, puis une dérégulation du métabolisme du fer, et éventuellement un stress oxydatif.

### III.4. Physiopathologie

Dès 1997, les analyses d'homogénats de cœur et de muscle de patients atteints de l'ataxie de Freidreich ont permis de constater un déficit d'activité des protéines à clusters FeS (Rötig et al., 1997). Des dépôts de fer ont été observés dans certains tissus comme le muscle cardiaque et le cervelet (Koeppen et al., 2011; Lamarche et al., 1980). Enfin, des marques de stress oxydatif ont été relevées dans le plasma et les urines des patients (Emond et al., 2000; Schulz et al., 2000). Ces trois caractéristiques sont étroitement liées et constituent un cercle vicieux, dont on ignorait le point de départ (Figure 34). Du fait de la propension de la frataxine à lier le fer, l'hypothèse initiale était que le déficit en frataxine entraînait de façon primaire une accumulation de fer, qui par la réaction de Fenton conduisait à la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour détruisaient les clusters FeS et donc perturbait le métabolisme du fer. Le développement des modèles souris avec des délétions tissu-spécifique par notre laboratoire a permis de montrer que l'événement découlant directement du déficit en frataxine était en fait le déficit en protéines FeS, l'accumulation de fer étant secondaire (Puccio et al., 2001; Seznec et al., 2005). S'agissant de l'aspect stress oxydant, cette hypothèse est encore débattue actuellement. Elle n'est en tous cas pas observée dans les modèles souris et n'a jamais été confirmée chez les patients depuis les études du début des années 2000.



## Résultats

---

### I - Le rôle de la frataxine au cours de la biosynthèse des clusters FeS

#### I.1. Contexte de l'étude

Des études précédentes réalisées dans le laboratoire font état de l'interaction de la frataxine au cœur du complexe NFS1/ISD11/ISCU et de la présence possible d'un cluster FeS dans le complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN. Le rôle de la frataxine au cours de la biosynthèse des clusters FeS est donc en questionnement. Différentes publications dans les modèles humain et bactérien font état d'une influence de la frataxine sur la production du sulfure. Auparavant, de multiples caractérisations de la capacité de fixation du fer sur la frataxine ont suggéré un éventuel rôle de donneur ou de régulateur de l'incorporation du fer. Cependant, aucune caractérisation fonctionnelle des complexes mammifères n'avait été faite.

#### I.2. Questions biologiques

- Quelle est l'influence de la frataxine sur la production de sulfure par NFS1 ?
- Quelle est son influence sur l'incorporation du fer ?
- Comment les complexes se comportent-ils au cours de la biosynthèse de clusters FeS ?
- Quels types de clusters sont synthétisés par les complexes ternaire et quaternaire ?
- Ces clusters sont-ils transférables ?
- *Parallèlement : quelle est la stœchiométrie du complexe ternaire et l'affinité de la frataxine pour celui-ci ?*

#### I.3. Conclusions des résultats

Nous avons pu démontrer qu'en interagissant avec le complexe ternaire NFS1/ISD11/ISCU, la frataxine modifie le niveau de production de sulfure et contrôle l'entrée du fer qu'elle promeut uniquement lorsque l'activité cystéine-désulfurase de NFS1 a lieu. La biosynthèse des clusters FeS sur les complexes ternaire et quaternaire conduit à la formation de clusters [4Fe-4S] de manières cinétiquement différentes, suggérant que la frataxine régule la formation des clusters. De manière tout à fait inédite, et malgré la non-dissociation des complexes contenant les clusters FeS, la frataxine multiplie par 3 l'efficacité de transfert des clusters [4Fe-4S] vers l'aconitase. Ceci permet de suggérer un rôle de la frataxine dans la biosynthèse mais également dans le transfert des clusters FeS, potentiellement en influant la structure du complexe NFS1/ISD11/ISCU.



# Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> Cluster Assembly

Florent Colin,<sup>†,‡,§,||,⊥</sup> Alain Martelli,<sup>†,‡,§,||,⊥</sup> Martin Clémancey,<sup>#</sup> Jean-Marc Latour,<sup>#</sup> Serge Gambarelli,<sup>∇</sup> Laura Zeppieri,<sup>†,‡,§,||,⊥</sup> Catherine Birck,<sup>‡,§,||,○</sup> Adeline Page,<sup>†,‡,§,||</sup> Hélène Puccio,<sup>\*,†,‡,§,||,⊥</sup> and Sandrine Ollagnier de Choudens<sup>\*,◆</sup>

<sup>†</sup>Translational Medicine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

<sup>‡</sup>INSERM, U596, Illkirch, France

<sup>§</sup>CNRS, UMR7104, Illkirch, France

<sup>||</sup>Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>⊥</sup>Collège de France, Chaire de Génétique Humaine, Illkirch, France

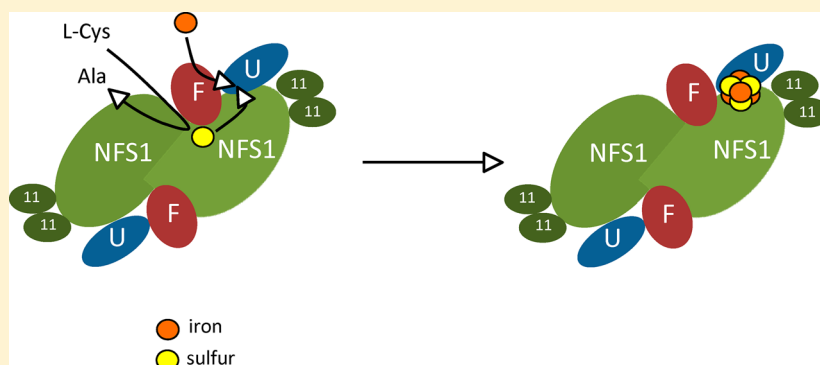
<sup>#</sup>DSV/iRTSV/CBM, UMR 5249 CEA-Université Grenoble I-CNRS/Equipe de Physicochimie des Métaux en Biologie, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

<sup>∇</sup>DSM/INaC/SCIB UMR-E3 CEA-UJF/Laboratoire "Laboratoire de Résonance Magnétique", CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

<sup>○</sup>Structural Biology and Genomics Platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

<sup>◆</sup>DSV/iRTSV/CBM, UMR 5249 CEA-Université Grenoble I-CNRS/Equipe Biocatalyse, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

## Supporting Information



**ABSTRACT:** Iron–sulfur (Fe–S) cluster-containing proteins are essential components of cells. In eukaryotes, Fe–S clusters are synthesized by the mitochondrial iron–sulfur cluster (ISC) machinery and the cytosolic iron–sulfur assembly (CIA) system. In the mammalian ISC machinery, preassembly of the Fe–S cluster on the scaffold protein (ISCU) involves a cysteine desulfurase complex (NFS1/ISD11) and frataxin (FXN), the protein deficient in Friedreich’s ataxia. Here, by comparing the biochemical and spectroscopic properties of quaternary (ISCU/NFS1/ISD11/FXN) and ternary (ISCU/NFS1/ISD11) complexes, we show that FXN stabilizes the quaternary complex and controls iron entry to the complex through activation of cysteine desulfurization. Furthermore, we show for the first time that in the presence of iron and L-cysteine, an [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] cluster is formed within the quaternary complex that can be transferred to mammalian aconitase (mACO2) to generate an active enzyme. In the absence of FXN, although the ternary complex can assemble an Fe–S cluster, the cluster is inefficiently transferred to ACO2. Taken together, these data help to unravel further the Fe–S cluster assembly process and the molecular basis of Friedreich’s ataxia.

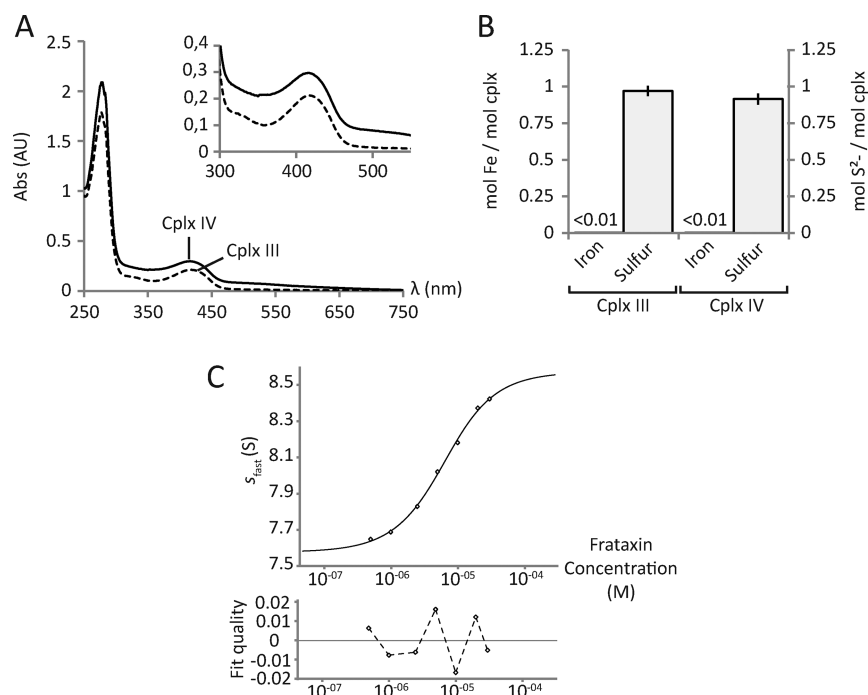
## INTRODUCTION

Iron–sulfur (Fe–S) clusters are critical redox-active prosthetic groups that are present in proteins involved in numerous essential cellular processes.<sup>1,2</sup> While the predominant functions of Fe–S clusters are in electron transfer and radical generation, they also participate in substrate binding and activation, protein stabilization, and regulation of gene expression or enzyme

activity. Within the past decade, the biogenesis of Fe–S proteins has been extensively studied by genetic and biochemical approaches in bacteria and yeast and more recently in plants and mammals, and this work has demonstrated that it

Received: September 3, 2012





**Figure 1.** Characterization of ternary and quaternary complexes. (A) UV-vis spectra of as-purified CplxIII (dashed line) and CplxIV (solid line). Inset: focus on the 300–500 nm region of the UV-vis spectra. (B) Iron and sulfur contents of as-purified CplxIII and CplxIV. In the assay, cysteine was converted to alanine, and the resulting persulfide was reduced with dithiothreitol (DTT) and detected as sulfide. (C) Signal-averaged value of the sedimentation coefficient at the reaction boundary ( $s_{\text{fast}}$ ) as a function of loading concentration for each sedimentation coefficient ( $s$ ) distribution. The best-fit binding isotherm (solid line) was obtained for parameter estimates of  $K_{d1} = 2.6 \mu\text{M}$ ,  $K_{d2} = 10.3 \mu\text{M}$ ,  $s_A = 7.58 \text{ S}$ ,  $s_B = 2.06 \text{ S}$ ,  $s_{AB} = 8.09 \text{ S}$ , and  $s_{ABB} = 8.58 \text{ S}$  using a heteroassociation model involving CplxIII (component A) with two equivalent binding sites for FXN (component B).

is a complex process involving multiple components.<sup>1–3</sup> Most of the components of the general “housekeeping” biosynthetic iron–sulfur cluster (ISC) machinery are highly conserved in almost all organisms, and several human orthologues are implicated in severe disorders,<sup>4</sup> pointing to the importance of this pathway for normal cellular function.

The initial stage of nascent Fe–S cluster biosynthesis, which is accomplished by a multimeric protein complex, involves the assembly of a transiently bound Fe–S cluster on a scaffold protein (IscU in bacteria, Isu1 in yeast, or ISCU in mammals) from inorganic sulfur and iron. The sulfur is provided through a persulfide intermediate by a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent cysteine desulfurase (IscS in bacteria, Nfs1/Isd11 in yeast, or NFS1/ISD11 in mammals). Although its exact function is unknown, the eukaryotic protein ISD11 has been proposed to stabilize NFS1 through a direct interaction and to activate the enzyme through a conformational change.<sup>5–7</sup> The scaffold and the cysteine desulfurase interact to form in bacteria an  $\alpha_2\beta_2$  heterotetrameric complex, thus promoting direct sulfur transfer.<sup>8–10</sup> The sources of the iron and the required electrons have not been clearly identified, although frataxin and ferredoxin have been suggested as the iron and electron donors, respectively.<sup>11,12</sup> Once assembled, the scaffold-bound Fe–S clusters are transferred to target proteins with the help of accessory proteins and factors.<sup>1,2</sup> In eukaryotes, the assembly of the nascent Fe–S clusters takes place in the mitochondria.

Frataxin is a conserved small globular mitochondrial protein whose reduced expression causes the severe neurodegenerative disease Friedreich’s ataxia by impairing Fe–S cluster biogenesis and iron metabolism.<sup>13,14</sup> Although frataxin has been proposed to be a multifunctional protein involved in different iron-dependent mitochondrial pathways, phylogenetic, genetic, and

biochemical studies point to the essential role of frataxin in Fe–S metabolism.<sup>15–19</sup>

Early in vitro studies of bacterial, yeast, or human frataxin showed a mild to low affinity for ferrous iron (3–55  $\mu\text{M}$  range) through an interaction with a conserved acidic ridge of the mature protein.<sup>20–22</sup> The proposed function of frataxin as an iron donor was suggested by both the iron-dependent interaction of yeast frataxin with Nfs1 and Isu1<sup>23</sup> and in vitro studies demonstrating the capacity of iron-loaded mature human frataxin to provide iron for Fe–S cluster formation on ISCU.<sup>20</sup> Frataxin has also been shown to form oligomers in the presence of iron in vitro, initially suggesting an iron detoxification and storage function for frataxin.<sup>11,24,25</sup> However, this hypothesis has been questioned in vivo. Indeed, the deletion of yeast frataxin can be complemented by a frataxin mutant defective in iron-induced oligomerization.<sup>26</sup> Furthermore, the mature form of human frataxin (FXN<sub>81–210</sub>), which has been shown not to oligomerize,<sup>27</sup> rescued the cellular viability of murine fibroblasts deleted for frataxin.<sup>16</sup> Both of these results indicate that the formation of oligomers is not a requisite for frataxin to be functional. On the other hand, in vitro reconstitution experiments showed that oligomeric iron-loaded bacterial (CyaY) and yeast (Yfh1) frataxins could provide iron for Fe–S cluster formation on the scaffold protein (IscU/Isu1).<sup>11,20</sup> More recently, the possibility that frataxin might act as a regulator of cysteine desulfurase activity (positive in eukaryotes or negative in prokaryotes) has emerged.<sup>15,17</sup>

Using a coexpression approach, we previously showed that murine frataxin interacts in an iron-independent manner with a preformed ternary complex composed of NFS1, ISD11, and ISCU, thus leading to a quaternary complex.<sup>16</sup> To dissect further the role of frataxin in the first step of Fe–S biogenesis in

mammalian eukaryotes, we studied and compared the biochemical and biophysical properties of the recombinant ternary (CplxIII) and quaternary (CplxIV) complexes in the presence of the two key substrates of Fe–S assembly, iron and cysteine. Herein we report for the first time that mammalian frataxin controls iron entry on CplxIV through activation of its cysteine desulfurase activity, allowing the formation of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  clusters.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Structural and Enzymatic Characterization of Ternary and Quaternary Complexes Formed in Vivo in a Heterologous System.** To determine the role of frataxin in the early steps of Fe–S formation, as a prerequisite, we biochemically and functionally characterized the as-purified recombinant CplxIII and CplxIV complexes formed in vivo (see the Supporting Information). Pure CplxIII has a mass of 161 052 Da as determined by electrospray ionization time of flight (ESI-TOF) mass spectrometry, in agreement with the mass of 160 kDa estimated from the retention time on gel filtration (Figure S1 in the Supporting Information). This suggests a homodimeric complex in which each unit has a 1:2:1 NFS1:ISD11:ISCU stoichiometry. CplxIV eluted as a single peak with an apparent molecular weight of 185 kDa (Figure S1 in the Supporting Information), in agreement with the reported mass of 189 623 Da,<sup>16</sup> also suggesting a homodimeric organization in which each unit has a 1:2:1:1 NFS1:ISD11:ISCU:FXN stoichiometry. As-purified CplxIII and CplxIV displayed a yellow color (absorption band at 420 nm) corresponding to PLP bound on NFS1 (1.9 ± 0.1 PLP/Cplx, respectively) (Figure 1A) but were devoid of iron (<0.01 Fe/Cplx) and contained small amounts of sulfur (0.97 ± 0.04 S/CplxIII and 0.91 ± 0.05 S/CplxIV), likely in a persulfide intermediate form on NFS1 (Figure 1B). In contrast to CplxIII, which precipitated upon freezing–thawing, CplxIV was stable toward freezing–thawing, suggesting a stabilizing effect of frataxin for CplxIII. Interestingly, a quaternary complex (named the “quaternized complex”) can be formed from pure CplxIII and free monomeric frataxin (Figure S1 in the Supporting Information). To determine the affinity of frataxin for CplxIII, we performed analytical ultracentrifugation (AUC) sedimentation velocity experiments using different CplxIII:FXN ratios (Figure 1C; see the Supporting Information for details). In the titration of CplxIII with increasing concentrations of FXN, the peak in the sedimentation complex [*s*, measured in svedbergs (1 S = 10<sup>-13</sup> s)] for the complex exhibited a concentration-dependent movement characteristic of a rapidly interacting system (Figure 1C). The peak for CplxIII alone (7.45 S) was shifted toward the *s* value of 8.6 S expected for a 1:2 CplxIII:FXN complex through an intermediate *s* value of 8.1 S expected for a 1:1 CplxIII:FXN complex. Data analysis of the signal-averaged *s* value at the reaction boundary (*s*<sub>fast</sub>) as a function of loading concentration gave estimated *K*<sub>d</sub> values of ~2.6 μM (*K*<sub>d1</sub>) and 10.3 μM (*K*<sub>d2</sub>) for the 1:1 and 1:2 complexes, respectively.

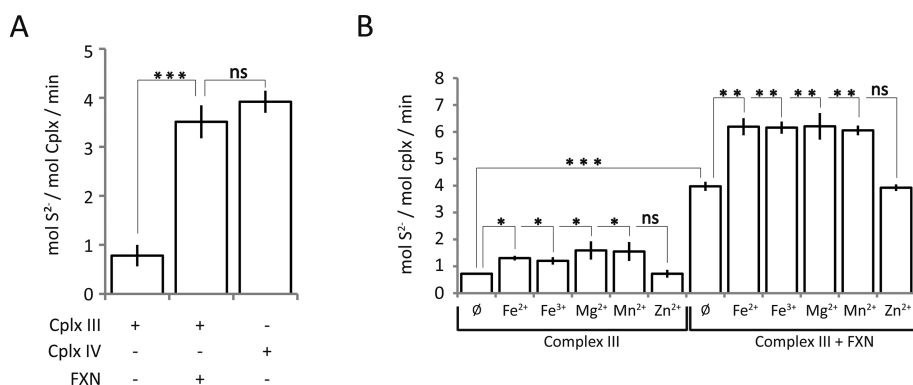
Both CplxIII and CplxIV were endowed with cysteine desulfurase activity carried by the NFS1 protein, which we evaluated by measuring alanine and sulfide production (Figure S2A in the Supporting Information). As-purified CplxIV exhibited Michaelis–Menten kinetics for sulfide production with a Michaelis constant (*K*<sub>M</sub>) of 6.7 μM for cysteine and a *k*<sub>cat</sub> of 3.9 min<sup>-1</sup> (Table 1). The value of *k*<sub>cat</sub> decreased by a factor of 5 (*k*<sub>cat</sub> = 0.85 min<sup>-1</sup>) and the *K*<sub>M</sub> increased by a factor of 1.5

**Table 1. Kinetic Data for CplxIII and CplxIV Enzymatic Activity**

	<i>k</i> <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	<i>K</i> <sub>M</sub> (μM)
CplxIII	0.85	10.7
CplxIV	3.9	6.7

(*K*<sub>M</sub> = 10.7 μM) with CplxIII, demonstrating that both *k*<sub>cat</sub> and *K*<sub>M</sub> were altered by the presence of FXN (Table 1). The cysteine desulfurase activity was stable over time (2–14 days) for CplxIV, whereas it was dramatically affected for CplxIII after 8 days, indicating a stabilizing effect of frataxin on the enzymatic activity of CplxIII (Figure S2 in the Supporting Information). The quaternized complex displayed a cysteine desulfurase activity similar to that of the as-purified CplxIV (*k*<sub>cat</sub> = 3.6 min<sup>-1</sup>) (Figure 2A), demonstrating that it is the presence of frataxin that enhances the cysteine desulfurase activity. As ferrous iron was reported specifically to enhance by an additional factor of 2 the cysteine desulfurase activity of NFS1/ISD11 in the presence of FXN and ISCU,<sup>15</sup> we explored the sulfide production by both complexes in the presence of iron. Under our conditions, iron ions (Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>) had a small stimulatory effect (1.5-fold) on the sulfide production of both CplxIII and the quaternized complex (Figure 2B), but this effect was not specific to iron, since Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> gave a similar stimulation. Zn<sup>2+</sup> had no effect.

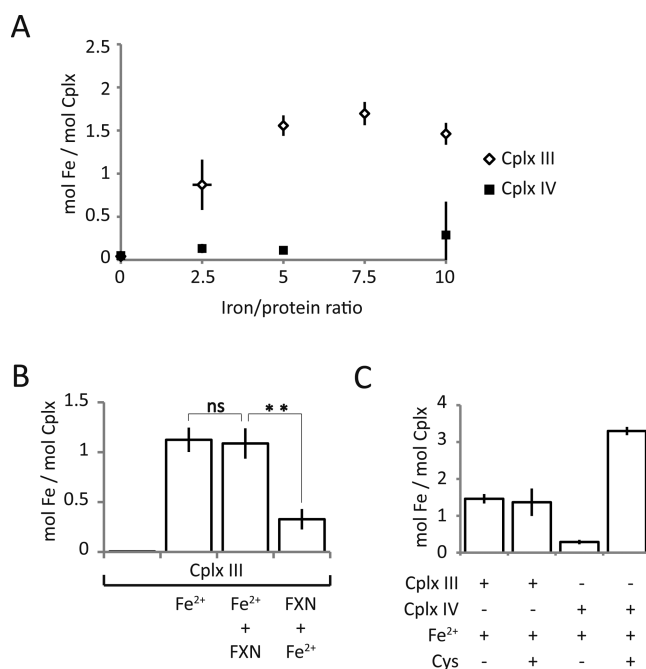
These results provide for the first time a consolidated characterization of mammalian CplxIII and CplxIV. The high level of expression of the complexes as well as the purification steps performed under aerobiosis lead to the isolation of cluster-free complexes. The isolation of both complexes from *Escherichia coli* extracts strongly suggests that they represent functional states for Fe–S cluster biosynthesis and that they are mechanistically relevant species for unraveling the Fe–S biogenesis process. Two observations can be drawn from the stoichiometries of the two complexes. (i) There is conservation with prokaryotes in the organization of the complexes: in the absence of frataxin, there are two cysteine desulfurases and two scaffolds,<sup>9,10</sup> and when frataxin is present, there are two cysteine desulfurases, two scaffolds, and two frataxins.<sup>28</sup> (ii) Mammalian FXN exists within CplxIV as a monomer (per unit of complex) rather than as an oligomeric form, reinforcing in vivo data demonstrating that the essential form is the monomeric one.<sup>16</sup> The AUC experiments confirmed the stoichiometry of two FXN per CplxIV. We also observed that FXN enhances the cysteine desulfurase activity as reported previously,<sup>15</sup> but the kinetic parameters were slightly different, probably reflecting differences in stability and/or homogeneity for as-purified complexes in comparison with complexes obtained by combining purified recombinant proteins. As the physiological concentration of cysteine in eukaryotic cells is 0.1 mM,<sup>29</sup> our data together indicate that FXN greatly stimulates the cysteine desulfurase activity at physiological cysteine concentrations. In addition, our data demonstrate that cysteine desulfurase activation by FXN is iron-independent, in contrast to published results,<sup>15</sup> and that frataxin accounts for the main stimulatory effect of cysteine desulfurase activity. FXN binding and stimulation of the cysteine desulfurase activity are reminiscent of the behavior of sulfur-acceptor proteins in bacterial systems. Indeed, in *E. coli*, the IscS activity is stimulated 6-fold by IscU binding<sup>30</sup> and the SufS activity is increased 50-fold by SufE interactions.<sup>31</sup> Because there is no evidence that FXN directly participates in cysteine desulfurase catalysis and since FXN



**Figure 2.** FXN enhances the cysteine desulfurase activity of CplxIII. (A) Cysteine desulfurase activities of CplxIII, CplxIV, and the quaternized complex measured by sulfur quantitation. (B) Effect of a 10-fold molar excess of Fe<sup>2+</sup> [from (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O], Fe<sup>3+</sup> (from FeCl<sub>3</sub>), Mn<sup>2+</sup> (from MnSO<sub>4</sub>), Mg<sup>2+</sup> (from MgCl<sub>2</sub>), or Zn<sup>2+</sup> (from ZnSO<sub>4</sub>) on the cysteine desulfurase activity of CplxIII and the quaternized complex. Symbols: ns, nonsignificant; \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

stimulates cysteine desulfurization in a ISCU-dependent manner,<sup>15</sup> FXN binding to CplxIII likely induces a conformational change that positions the NFS1 persulfide loop close to a conserved cysteine on ISCU for optimal sulfur transfer, thereby increasing cysteine turnover. Interestingly, the bacterial homologue CyaY displayed an inhibitory effect on Fe–S cluster biogenesis in reconstitution experiments in vitro and was found to decrease the enzymatic activity of IscS in the presence of IscU.<sup>17</sup> However, this difference between the mammalian and bacterial systems appears to be determined by the intrinsic properties of the cysteine desulfurase.<sup>32</sup>

**Fratxin Controls Iron Entry in the Quaternary Complex.** To investigate whether the presence of frataxin in CplxIV would modulate iron fixation, we compared the iron binding capacities of CplxIII and CplxIV (Figure 3A). The CplxIII Fe<sup>2+</sup> binding curve suggested a specific ferrous iron fixation that quickly saturated around 1.5 ± 0.12 Fe/Cplx (Figure 3A). On the contrary, CplxIV bound much less ferrous iron, despite a 10-fold molar excess (0.29 ± 0.39 Fe/Cplx). CplxIV did not show better affinity for the ferric form of iron, whereas CplxIII showed a great ability to bind ferric iron (Figure S3 in the Supporting Information). When FXN was added to CplxIII prior to iron, 0.33 ± 0.10 Fe/Cplx was detected, indicating that the quaternized complex had ferrous iron binding properties similar to those of CplxIV (Figure 3B). However, when the iron was added to CplxIII before FXN, 1.1 ± 0.15 Fe/Cplx was detected, a value comparable to that of CplxIII without FXN (Figure 3B). Taken together, these data indicate that frataxin inhibits binding of ferrous and ferric iron to the quaternary complex, which was quite surprising because bacterial and yeast frataxins have clearly been shown to bind and provide iron for Fe–S formation.<sup>11,20</sup> We therefore investigated iron binding to monomeric FXN by incubating FXN with an excess of either ferrous or ferric iron under the conditions used for CyaY.<sup>11</sup> We observed that the mature monomeric form of frataxin could bind ~1 Fe/FXN under all conditions used (Figure S4 in the Supporting Information), showing that FXN has different iron binding behavior when free and complexed. We then investigated whether the cysteine desulfurase activity of the complexes could influence iron entry. While activation of the cysteine desulfurase of CplxIII had no effect on iron binding (Figure 3C), interestingly, the iron content in CplxIV was significantly enhanced upon activation of the cysteine desulfurase. Indeed, roughly 3.5 ± 0.1 Fe/CplxIV were detected, corresponding to a 10-fold increase relative to



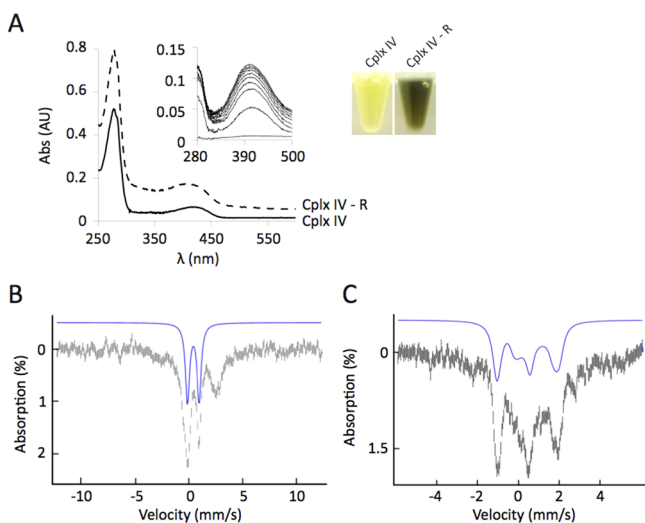
**Figure 3.** Control of iron entry by frataxin. (A) Iron contents of CplxIII and CplxIV after incubation for 1 h with different molar excess of Fe<sup>2+</sup> [from (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O] and desalting. (B) Iron content of the quaternized complex after incubation with Fe<sup>2+</sup> added either before or after FXN. (C) Iron content upon activation of the ternary and quaternary complexes' cysteine desulfurase activities (10 equiv of Fe<sup>2+</sup>, 10 equiv of cysteine, and 50 equiv of DTT followed by desalting). All of the experiments were done under anaerobic conditions. ns, nonsignificant; \*\*,  $p < 0.05$ .

the amount measured in the absence of cysteine desulfurization (Figure 3C). This increase in iron binding is due to activation of the cysteine desulfurase activity, as a CplxIV with a catalytically dead NFS1 hardly bound iron (Table S1 in the Supporting Information).

As for frataxins from other organisms, our results show that free murine frataxin is able to bind iron, albeit to a lesser extent. However, once complexed within CplxIV, frataxin loses its ability to bind iron. The FXN iron binding site is likely not available (hidden), in agreement with mutagenesis experiments,<sup>10,16</sup> structural data,<sup>10</sup> and modeling,<sup>28</sup> which suggest that the surface of interaction between IscS/NFS1 and CyaY/

FXN involves direct recognition of the negatively charged region of frataxin (which is involved in iron binding) by the positively charged patch on IscS/NFS1.<sup>28</sup> Upon activation of the cysteine desulfurase through FXN, iron enters within CplxIV. These results demonstrate that iron loading is dependent on sulfur production, thus suggesting a concerted mechanism for iron and sulfur arrival on CplxIV rather than a sequential mechanism. This question was addressed in previous studies using either free scaffold (IscU) or carrier (SufA) proteins without conclusive answers.<sup>33–35</sup> Although our data cannot rule out the possibility that sulfur arrives first, they clearly demonstrate that iron cannot arrive first. The Fe–S biogenesis mechanism should be further explored using the assembly complex rather than the free individual components to resolve this key question.

**Both Complexes Assemble  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  Clusters, Which Are More Efficiently Transferred in the Presence of Frataxin.** We investigated whether the presence of excess iron and the concomitant activation of cysteine desulfurase lead to the formation of Fe–S clusters within the complexes. We first analyzed CplxIV using UV–vis absorption, electron paramagnetic resonance (EPR), and Mössbauer spectroscopy. The absolute absorption variations of CplxIV during reconstitution (using a 4-fold molar excess of  $\text{Fe}^{2+}$ ) monitored by UV–vis spectroscopy (Figure 4A inset) showed an increase in the



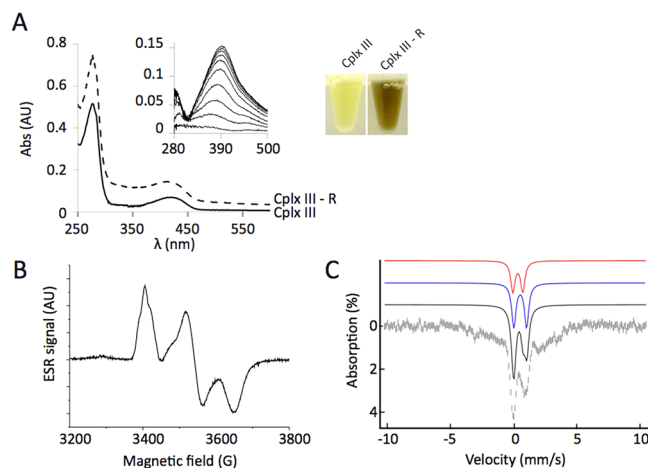
**Figure 4.** Fe–S cluster reconstitution on the quaternary complex. (A) UV–vis profiles of the quaternary complex before and after reconstitution. Insets: (left) absolute UV–vis absorbance variations during reconstitution (4 equiv of  $\text{Fe}^{2+}$ , 10 equiv of cysteine, and 50 equiv of DTT followed by desalting) and (right) CplxIV colors before and after reconstitution (CplxIV and CplxIV-R, respectively). (B, C) Mössbauer spectra of CplxIV-R (3.5 Fe/Cplx) taken at 4.2 K with an external magnetic field of (B) 0.06 and (C) 7 T applied parallel to the  $\gamma$  rays. The blue lines represent the contributions from  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters with parameters indicated in the text.

characteristic  $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  charge-transfer band at 420 nm simultaneously with the appearance of a dark-brown color in the solution (Figure 4A). After desalting, the reconstituted complex (CplxIV-R) contained  $6 \pm 0.95$  S/Cplx and  $3.5 \pm 0.04$  Fe/Cplx, values that were obtained within 15 min when the complex was incubated with Fe and cysteine (Figure S5A in the Supporting Information). This value was unchanged after analysis of the sample by size-exclusion chromatography (SEC)

(Figure S6A in the Supporting Information). A representative Mössbauer spectrum of CplxIV-R is depicted in Figure 4B. As is typical for reconstituted Fe–S proteins, the spectrum comprises several components: two major lines at  $-0.1$  and  $+1.3$  mm/s flanked by a broad peak at 2.5 mm/s in addition to a featureless component extending from  $-5$  to  $+5$  mm/s (most easily seen at high  $\text{Fe}^{2+}$ ). The central lines could be modeled using a quadrupole doublet whose isomer shift [ $\delta = 0.44(3)$  mm/s] and quadrupole splitting [ $\Delta E_Q = 1.09(6)$  mm/s] are indicative of an  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  cluster. This assignment is supported by the fact that the main features of the spectrum recorded with an applied magnetic field of 7 T (Figure 4C) could be reproduced using the above parameters assuming a spin  $S = 0$ , as expected for an  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  cluster.

Quantification of the main quadrupole doublet indicated that 42% of the iron belonged to the  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters. Similar values were found using 2–10 equiv of  $\text{Fe}^{2+}$  provided that the incubation time reached 1 h (Table S2 in the Supporting Information). The peak at 2.5 mm/s can originate from high-spin  $S = 2$  ferrous species, with the abnormal shape and broadening of the line being due to a mixture of hexa- and tetra-coordinate  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species. Assembly of the Fe–S cluster on CplxIV did not induce any dissociation of the complex, as assessed by the SEC elution profile on Superdex-200 (Figure S6A in the Supporting Information).

Under reconstitution conditions identical to those for CplxIV, the absolute absorption variations during reconstitution of CplxIII indicated the formation of Fe–S clusters (Figure 5A inset). During this process, CplxIII-R displayed a reddish-brown color (Figure 5A). As for CplxIV-R, no dissociation of the complex occurred once an Fe–S cluster was built (Figure S6B in the Supporting Information). CplxIII-R contained a maximum of  $1.8 \pm 0.2$  Fe/Cplx and  $2 \pm 0.1$  S/Cplx, contents that were reached within the first 15 min of the reconstitution,

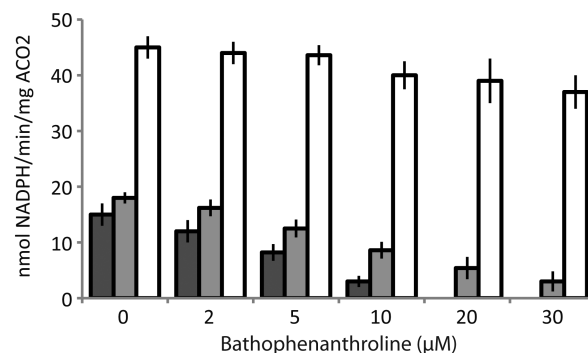


**Figure 5.** Fe–S cluster reconstitution on the ternary complex. (A) UV–vis profiles of the ternary complex before and after reconstitution (10 equiv of  $\text{Fe}^{2+}$ , 10 equiv of cysteine, and 50 equiv of DTT followed by desalting). Insets: (left) absolute UV–vis absorbance variations during reconstitution and (right) CplxIII color before and after reconstitution (CplxIII and CplxIII-R, respectively). (B) EPR signal of CplxIII-R (250  $\mu\text{M}$ ) recorded at 30 K with a microwave power of 0.5 mW. (C) Mössbauer spectrum of CplxIII-R (2.4 Fe/Cplx) taken at 4.2 K with an external magnetic field of 0.06 T applied parallel to the  $\gamma$  rays. The blue, red, and black solid lines represent the contributions from  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  and  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  clusters and their sum, respectively, with the parameters indicated in the text.

as for CplxIV-R (Figure S5A in the Supporting Information). This content could not be further increased despite the addition of a greater excess of iron to the complex and remained after SEC on Superdex-200. CplxIII-R was reproducibly EPR-active with an  $S = 1/2$  species characterized by a rhombic signal ( $g$  values of 2.026, 1.947, and 1.889;  $g_{av} = 1.954$ ) that integrated for 16% of the total iron of the complex (Figure 5B). These  $g$  values are similar to those observed for the  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  cluster of plant ferredoxin.<sup>36</sup> The temperature dependence and microwave power saturation properties (signal visible up to 60 K without broadening) also pointed to an  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  cluster. CplxIV-R exhibited the same signal but with a very low intensity (Figure S5B in the Supporting Information). Figure 5C presents a representative Mössbauer spectrum of the CplxIII-R complex that was recorded as in Figure 4C for the quaternary complex. Whereas the two spectra are globally similar, significant differences exist. Indeed, the higher-velocity line of the central doublet appears abnormally broad, and this effect is maximized at high  $\text{Fe}^{2+}$  concentration. It follows that the central doublet could not be simulated with a single component. By contrast, a good simulation was obtained by considering that two species, an  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  cluster and an  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  cluster, contribute to this doublet. The simulation presented in Figure 5C was obtained by including a 19% contribution of an  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  cluster as found in IscU (average parameters  $\delta = 0.29$  mm/s and  $\Delta E_Q = 0.78$  mm/s) in addition to 27% contribution of an  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  cluster with parameters  $\delta = 0.45(3)$  mm/s and  $\Delta E_Q = 0.98(6)$  mm/s, similar to those of the quaternary complex. The featureless component extending from  $-5$  to  $5$  mm/s may come from adventitiously bound iron species and/or reduced  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$  and  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  clusters, as observed by EPR for the latter. Taken together, these results demonstrate that CplxIII-R can assemble in vitro both  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$  clusters in the 1+ and 2+ states and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters.

We finally investigated whether CplxIII-R and CplxIV-R could provide their  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  clusters to target enzymes by incubating them anaerobically with the apo form of mammalian mitochondrial aconitase (mACO2), a well-characterized  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  protein.<sup>37</sup> mACO2 was pretreated with dithiothreitol (DTT), desalted, and then incubated with either 2.5 equiv of CplxIII-R or 1.25 equiv of CplxIV-R in order to provide the same amounts of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  cluster to mACO2. Under such conditions, the control containing apo-mACO2 and an excess of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{S}^{2-}$  gave an activity of  $15.0 \pm 1.9$  nmol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ . CplxIII-R could also mature aconitase ( $18.2 \pm 1.4$  nmol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ) to a level similar to that obtained using free iron and sulfide. By contrast, CplxIV-R activated mACO2 with an enzymatic activity of  $46.2 \pm 2.1$  nmol of NADPH  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ , which is 3-fold higher than those of the control and CplxIII-R (Figure 6). This demonstrates that CplxIV-R is more efficient in maturing mACO2 than either CplxIII-R or free iron and sulfide.

Addition of increasing concentrations of a strong Fe chelator, bathophenanthroline, to the standard reaction mixture had little effect on the Fe–S cluster transfer from CplxIV-R to mACO2 (17% loss at 30  $\mu\text{M}$ ). At the same concentration, bathophenanthroline inhibited roughly completely the cluster transfer from CplxIII-R (83% loss) (Figure 6). Interestingly, cluster transfer from CplxIII-R closely parallels that of chemical reconstitution. This suggests that cluster transfer to mACO2 from CplxIII-R is likely due in part to release of Fe–S in the medium, while cluster transfer from CplxIV-R is a concerted process.



**Figure 6.** Fe–S cluster transfer from CplxIII-R and CplxIV-R to apo-mACO2. Aconitase activity was measured after transfer of the  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  cluster from CplxIII-R (gray bars) or CplxIV-R (white bars) in the presence of increasing amounts of the iron chelator bathophenanthroline. The mACO2 activity control was measured upon addition of a 4-fold molar excess of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{S}^{2-}$  (black bars). The mACO2 activity was measured after 30 min of incubation with 2.5 equiv of CplxIII-R (2 Fe/Cplx) or 1.25 equiv of CplxIV-R (4 Fe/Cplx), respectively. All of the experiments were done under anaerobic conditions at 17 °C.

Taken together, these results demonstrate that CplxIII-R and CplxIV-R assemble mainly  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters in vitro. This is the first time that an Fe–S cluster has been observed and characterized spectroscopically on mammalian ISC assembly complexes. There are 2 ISCU/Cplx, and our quantification demonstrates that there is reproducibly no more than 0.4 and 0.27  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  cluster per CplxIV-R and CplxIII-R, respectively. As there is no dissociation of CplxIV-R after Fe–S assembly, our results suggest that only one ISCU of CplxIV-R is metalated. It is tempting to propose that only one unit of CplxIV-R is active, maybe by negative-cooperative regulation between the subunits through structural changes, as has been proposed for other PLP enzymes.<sup>38</sup> Interestingly, the same amount of high-spin ferrous iron on CplxIV-R was also consistently found. Whether this iron is located on the second ISCU of CplxIV-R and its physiological relevance are currently under investigation. Furthermore, for the first time, an  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  species was also observed on the mammalian Fe–S assembly machinery. This is surprising considering that no reducing agent typically used to observe such a species (e.g., dithionite) was present in the reaction. DTT was probably responsible for the formation of this species, as observed on the bacterial Fe–S carrier SufA.<sup>39</sup> The fact that it is observable mainly on CplxIII-R likely results because CplxIII-R contains a greater amount of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters with regard to total iron. The  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  species may correspond to an intermediate in the formation of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters from  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  clusters, as proposed for the general  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  assembly process<sup>40</sup> and recently demonstrated in the case of *nif*IscA.<sup>41</sup> In this respect, it is worth noting that the successive formation of  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  clusters has been observed in the bacterial system.<sup>42</sup> In agreement with an enhancement of the cysteine desulfurase activity in the presence of frataxin, neither  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  species nor  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$  intermediates were observed on CplxIV-R (Table S2 in the Supporting Information). Finally, in contrast to CplxIII-R, CplxIV-R is able to mature mACO2. However, the mACO2 activity obtained with CplxIV-R is low compared with that of a reconstituted mACO2 (200 nmol of NADPH  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ), suggesting that some components needed for total and efficient Fe–S transfer are missing, such as the chaperones and/or ferredoxin.

## ■ CONCLUSION

To the best of our knowledge, this is the first demonstration that both CplxIII and CplxIV of the mammalian Fe–S assembly machinery can assemble  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  clusters without dissociation of the complexes. Our results also provide evidence that mammalian frataxin stabilizes CplxIII and controls iron entry on CplxIV through activation of its cysteine desulfurase activity. The presence of FXN leads to a greater amount of  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  cluster per complex and to a transferable  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  cluster. The properties of CplxIII-R are consistent with the biochemical phenotype associated with Friedreich's ataxia and with Friedreich's ataxia conditional mouse models that show residual Fe–S enzyme activities in the absence of frataxin.<sup>43,44</sup> Our results provide consolidated information that is crucial for unraveling both the Fe–S cluster assembly process and the molecular basis of Friedreich's ataxia. Further work using these complexes with the addition of other essential components of the Fe–S assembly and transfer machinery should be performed to understand this essential metabolic pathway.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

Recombinant CplxIV was obtained by coexpression of murine NFS1, ISD11, ISCU, and FXN-His in *E. coli* and purified as reported previously,<sup>16</sup> except that an affinity cobalt column was used. Recombinant CplxIII was obtained by coexpression of murine NFS1, ISD11, and ISCU-His in *E. coli* and purified as for CplxIV. GST-mACO2 production and purification were carried out as previously described.<sup>16</sup> The quaternized complex was obtained by mixing CplxIII with a 3-fold excess of free FXN. Protein-bound iron and sulfur quantitations were carried out as previously described.<sup>45,46</sup> AUC sedimentation experiments were used to determine the affinity of FXN to CplxIII. The cysteine desulfurase activity of complexes was determined as detailed for alanine production<sup>47</sup> and for sulfide release.<sup>45</sup> Fe–S cluster assembly on CplxIII and CplxIV was performed using L-cysteine and a ferrous iron salt as the sulfur and iron sources, respectively, as reported previously,<sup>48</sup> and the Fe–S transfer experiment to aconitase was performed as detailed elsewhere.<sup>49</sup> Structural characterization of CplxIII and CplxIV was performed by UV–vis absorption, Mössbauer, and EPR spectroscopy.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 🔗 Supporting Information

Experimental methods for expressing, purifying, and assaying the proteins used in this work; protocols used for cluster transfer reactions; and spectroscopic analyses for Fe–S cluster characterization. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

hpuccio@igbmc.fr; sollagnier@cea.fr

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Levy, F. Klein, and A. Hick (IGBMC, Strasbourg) for technical help and S. Schmucker (IGBMC, Strasbourg), E. Mulliez (CBM, Grenoble), and M. Fontecave (Collège de France, Paris) for scientific discussions and suggestions. This work was supported by the European Community under the European Research Council [206634/ISCATAXIA] (to H.P.) and the Seventh Framework Programme [242193/EFACTS] (to H.P.). F.C. was a recipient of a Ph.D. fellowship from La Fondation Sébastien Grosjean contre les Maladies Orphelines.

J.-M.L. acknowledges the support of the Région Rhone-Alpes through Contract CIBLE 07 016335, and S.O.d.C. acknowledges the support of the ANR FeStres.

## ■ REFERENCES

- (1) Lill, R. *Nature* **2009**, *460*, 831.
- (2) Fontecave, M.; Ollagnier-de-Choudens, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 226.
- (3) Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 247.
- (4) Rouault, T. A. *Dis. Models Mech.* **2012**, *5*, 155.
- (5) Wiedemann, N.; Urzica, E.; Guiard, B.; Müller, H.; Lohaus, C.; Meyer, H. E.; Ryan, M. T.; Meisinger, C.; Mühlhoff, U.; Lill, R.; Pfanner, N. *EMBO J.* **2006**, *25*, 184.
- (6) Pandey, A.; Yoon, H.; Lyver, E. R.; Dancis, A.; Pain, D. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38242.
- (7) Adam, A. C.; Börnhovd, C.; Prokisch, H.; Neupert, W.; Hell, K. *EMBO J.* **2006**, *25*, 174.
- (8) Raulfs, E. C.; O'Carroll, I. P.; Dos Santos, P. C.; Unciuleac, M. C.; Dean, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 8591.
- (9) Marinoni, E. N.; de Oliveira, J. S.; Nicolet, Y.; Raulfs, E. C.; Amara, P.; Dean, D. R.; Fontecilla-Camps, J. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 5439.
- (10) Shi, R.; Proteau, A.; Villarroya, M.; Moukadiri, I.; Zhang, L.; Trempe, J. F.; Matte, A.; Armengod, M. E.; Cygler, M. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, No. e1000354.
- (11) Layer, G.; Ollagnier-de Choudens, S.; Sanakis, Y.; Fontecave, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16256.
- (12) Chandramouli, K.; Unciuleac, M. C.; Naik, S.; Dean, D. R.; Huynh, B. H.; Johnson, M. K. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6804.
- (13) Campuzano, V.; Montermini, L.; Molto, M. D.; Pianese, L.; Cossee, M.; Cavalcanti, F.; Monros, E.; Rodius, F.; Duclos, F.; Monticelli, A.; Zara, F.; Canizares, J.; Koutnikova, H.; Bidichandani, S. I.; Gellera, C.; Brice, A.; Trouillas, P.; De Michele, G.; Filla, A.; De Frutos, R.; Palau, F.; Patel, P. I.; Di Donato, S.; Mandel, J. L.; Coccozza, S.; Koenig, M.; Pandolfo, M. *Science* **1996**, *271*, 1423.
- (14) Schmucker, S.; Puccio, H. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, R103.
- (15) Tsai, C. L.; Barondeau, D. P. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9132.
- (16) Schmucker, S.; Martelli, A.; Colin, F.; Page, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Reutenauer, L.; Puccio, H. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e16199.
- (17) Adinolfi, S.; Iannuzzi, C.; Prischi, F.; Pastore, C.; Iametti, S.; Martin, S. R.; Bonomi, F.; Pastore, A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 390.
- (18) Huynen, M. A.; Snel, B.; Bork, P.; Gibson, T. J. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2463.
- (19) Mühlhoff, U.; Richhardt, N.; Ristow, M.; Kispal, G.; Lill, R. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2025.
- (20) Yoon, T.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6078.
- (21) Nair, M.; Adinolfi, S.; Pastore, C.; Kelly, G.; Temussi, P.; Pastore, A. *Structure* **2004**, *12*, 2037.
- (22) Cook, J. D.; Bencze, K. Z.; Jankovic, A. D.; Crater, A. K.; Busch, C. N.; Bradley, P. B.; Stemmler, A. J.; Spaller, M. R.; Stemmler, T. L. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7767.
- (23) Gerber, J.; Mühlhoff, U.; Lill, R. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 906.
- (24) Gakh, O.; Park, S.; Liu, G.; Macomber, L.; Imlay, J. A.; Ferreira, G. C.; Isaya, G. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 467.
- (25) Adamec, J.; Rusnak, F.; Owen, W. G.; Naylor, S.; Benson, L. M.; Gacy, A. M.; Isaya, G. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *67*, 549.
- (26) Aloria, K.; Schilke, B.; Andrew, A.; Craig, E. A. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 1096.
- (27) Gakh, O.; Bedekovics, T.; Duncan, S. F.; Smith, D. Y., IV; Berkholtz, D. S.; Isaya, G. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38486.
- (28) Prischi, F.; Konarev, P. V.; Iannuzzi, C.; Pastore, C.; Adinolfi, S.; Martin, S. R.; Svergun, D. I.; Pastore, A. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 95.
- (29) Furne, J.; Saeed, A.; Levitt, M. D. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R1479.
- (30) Kato, S.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Takahashi, Y.; Tokumoto, U.; Yoshimura, T.; Esaki, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5948.

- (31) Loiseau, L.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Nachin, L.; Fontecave, M.; Barras, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38352.
- (32) Bridwell-Rabb, J.; Iannuzzi, C.; Pastore, A.; Barondeau, D. P. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2506.
- (33) Sendra, M.; Ollagnier de Choudens, S.; Lascoux, D.; Sanakis, Y.; Fontecave, M. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 1362.
- (34) Nuth, M.; Yoon, T.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8774.
- (35) Smith, A. D.; Agar, J. N.; Johnson, K. A.; Frazzon, J.; Amster, I. J.; Dean, D. R.; Johnson, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11103.
- (36) Gambarelli, S.; Mouesca, J. M. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 1441.
- (37) Dupuy, J.; Volbeda, A.; Carpentier, P.; Darnault, C.; Moulis, J. M.; Fontecilla-Camps, J. C. *Structure* **2006**, *14*, 129.
- (38) Selbach, B.; Earles, E.; Dos Santos, P. C. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8794.
- (39) Gupta, V.; Sendra, M.; Naik, S. G.; Chahal, H. K.; Huynh, B. H.; Outten, F. W.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6149.
- (40) Krebs, C.; Agar, J. N.; Smith, A. D.; Frazzon, J.; Dean, D. R.; Huynh, B. H.; Johnson, M. K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14069.
- (41) Mapolelo, D. T.; Zhang, B.; Naik, S. G.; Huynh, B. H.; Johnson, M. K. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8071.
- (42) Agar, J. N.; Krebs, C.; Frazzon, J.; Huynh, B. H.; Dean, D. R.; Johnson, M. K. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7856.
- (43) Puccio, H.; Simon, D.; Cossee, M.; Criqui-Filipe, P.; Tiziano, F.; Melki, J.; Hindelang, C.; Matyas, R.; Rustin, P.; Koenig, M. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 181.
- (44) Martelli, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Schmucker, S.; Bouvet, S.; Reutenauer, L.; Puccio, H. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2651.
- (45) Beinert, H. *Anal. Biochem.* **1983**, *131*, 373.
- (46) Fish, W. W. *Methods Enzymol.* **1988**, *158*, 357.
- (47) Yoshida, A. *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 383.
- (48) Wollers, S.; Layer, G.; Garcia-Serres, R.; Signor, L.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23331.
- (49) Tsaousis, A. D.; Ollagnier de Choudens, S.; Gentekaki, E.; Long, S.; Gaston, D.; Stechmann, A.; Vinella, D.; Py, B.; Fontecave, M.; Barras, F.; Lukes, J.; Roger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 10426.

# Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster assembly

Florent Colin<sup>1,2,3,4,5</sup>, Alain Martelli<sup>1,2,3,4,5</sup>, Martin Clémancey<sup>6</sup>, Jean-Marc Latour<sup>6</sup>, Serge Gambarelli<sup>7</sup>, Laura Zeppieri<sup>1,2,3,4,5</sup>, Catherine Birck<sup>2,3,4,8</sup>, Adeline Page<sup>1,2,3,4</sup>, H  l  ne Puccio<sup>1,2,3,4,5\*</sup>, Sandrine Ollagnier de Choudens<sup>9\*</sup>

<sup>1</sup> Translational Medecine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France;

<sup>2</sup> INSERM, U596, Illkirch, France;

<sup>3</sup> CNRS, UMR7104, Illkirch, France;

<sup>4</sup> Université de Strasbourg, Strasbourg, France;

<sup>5</sup> Collège de France, Chaire de génétique humaine, Illkirch, France;

<sup>6</sup> DSV/iRTSV/LCBM, UMR 5249 CEA-Université Grenoble I-CNRS/ Equipe de Physicochimie des Métaux en Biologie, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

<sup>7</sup> DSM/INaC/SCIB UMR-E3 CEA-UJF/Laboratoire "Laboratoire de résonance magnétique", CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 09, France

<sup>8</sup> Structural biology and genomics platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

<sup>9</sup> DSV/iRTSV/LCBM, UMR 5249 CEA-Université Grenoble I-CNRS/ Equipe Biocatalyse, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France



## Supplementary Experimental section

### Plasmid constructs

The cloning of mouse *NFS1* and *ISD11* cDNAs into pCo0GWS was previously described.<sup>1</sup> Cloning of mouse *FXN* and *ISCU* cDNAs was previously reported.<sup>2</sup> Mature forms of mouse *ISCU* and *ISCU-HIS* were PCR amplified (Forward: AATAATCATATGGCCTACCACAAGAAGGTTGTGGATC; Reverse for ISCU: ATTATTAGATCTTCACTGCTTCTCTGGCTCCTCCTTC; reverse for ISCU-HIS: ATTATTAGATCTTCAGTGATGATGATGATGATGCTGCTTCTCTGGCTCCTCCTTC) and the resulting PCR products were subcloned into pET-DuetTM1 (Novagen) using NdeI and BglII restriction sites. Mature form of mouse *FXN-HIS* was PCR amplified (Forward: AATAATCCATGGGGACATTGGACAACCC; Reverse: CCTATTCTGGAAAAGGCACTCATCATCATCATCATCATTGAGGATCCAATAAT) and subcloned into pCOLA-DuetTM1 (Novagen) using NcoI and BamHI restriction sites. The *NFS1C375A* construct was obtained by PCR mutagenesis on the pCo0GWS-NFS1-ISD11. (Forward: CCTTGTCTCAGGGAGTGCCGCCACTTCTGCGTCATTGGAGCC, Reverse: GGCTCCAATGACGCAGAAGTGGCGGCACTCCCTGAGGACAAGG).

### Strain and growth conditions

BL21(DE3) bacteria containing pRARE2 plasmid (Novagen) were used for the production of all proteins. For the production of the NFS1/ISD11/ISCU-HIS ternary complex, bacteria were transformed with a combination of pCo0GWS-NFS1/ISD11 and pETDuet-ISCU-HIS, and then cultured in 2xYT or 2xLB supplemented with 37.5 µg/mL of spectinomycin and carbenicillin, 25.5 µg/mL of chloramphenicol. For the production of the NFS1/ISD11/ISCU/FXN-HIS quaternary complex, bacteria were transformed with a combination of pCo0GWS-NFS1/ISD11, pETDuet-ISCU and pCOLA-FXN-HIS, and then cultured in 2xYT or 2xLB supplemented with 25 µg/ml of spectinomycin, carbenicillin and kanamycin, and 17 µg/ml of chloramphenicol. For both productions, media were supplemented with 100 µM of pyridoxal phosphate (PLP) and cells were grown to reach an O.D.600nm of 2.0. IPTG was then added to a final concentration of 0.1 mM to induce the production of the recombinant complexes for 12-16h at 28°C.

## Recombinant protein purification

Bacterial pellet was resuspended in cold Tris-HCl 50 mM pH8.0, NaCl 150 mM, TCEP 1mM (TNT solution), supplemented with 100  $\mu$ M PLP, 10% glycerol and Complete protein inhibitor cocktail (Roche). Typically, for a 6L production, the pellet was resuspended in a final volume of 200 mL and sonicated for 15 effective minutes at 40% of amplitude using 1s on/off pulses, at a controlled maximum temperature of 8°C. The suspension was then ultra-centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman 50.2 Ti rotor for 1h at 4°C. The supernatant was filtered using a 0.45  $\mu$ m filter and incubated with TALON® cobalt resin (6 to 9 ml resin for 200 ml supernatant) for 20min in batch. The mix was loaded on chromatography columns (BIORAD) and washed with TNT solution (30 column volumes). Elution was performed with TNT solution containing 200 mM imidazole. The complex was further purified by gel-filtration (GF) on a FPLC (ÄKTA, GE Healthcare) using a Superdex-200 26/60 (GE Healthcare) equilibrated with TNT buffer. GF allowed simultaneous purification of the ternary NFS1/ISD11/ISCU-His complex and ISCU-HIS or the quaternary NFS1/ISD11/ISCU/FXN-HIS complex and FXN-HIS. Typically, 25 mg of ternary and 50 mg quaternary complex were obtained using 6L of culture. GST-mACO2 production and purification were carried out as previously described.<sup>1</sup> Protein samples were separated on a 12% SDS-Glycine-PAGE, under standard conditions. Native-PAGE analysis of quaternized complex was performed as previously described.<sup>1</sup>

## Protein, iron and sulfur quantification

Protein quantification was performed on a Nanodrop (Thermo Scientific) using the following theoretical values for molecular mass and extinction coefficient at 280 nm (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>): Ternary complex: 161kDa, 119.84  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ; Quaternary complex: 189 kDa, 171.90  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ; ISCU-HIS: 15.6 kDa, 10.01  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ; FXN-HIS: 15.3 kDa, 26.03  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . When complexes were reconstituted, Bradford assay was used to assess concentrations. Iron and sulfur quantifications were carried out as previously described.<sup>3,4</sup>

### Cysteine desulfurase activity

Assays were performed under strict anaerobic conditions in TNT solution supplemented with 100  $\mu\text{M}$  PLP and 1 mM DTT in a final volume of 450  $\mu\text{L}$ . Final complex concentration was 1  $\mu\text{M}$ . Reactions were initiated by the addition of L-Cysteine (10  $\mu\text{M}$ -1 mM) and were incubated at 37°C. Sulfide production was linear for the first 30 min. and an incubation time of 10 min. was chosen to generate sufficient amount of sulfide for detection. Aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) were analyzed by two alternative methods (sulfur or alanine quantification). For sulfur quantification, 300  $\mu\text{L}$  of  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1% and 15  $\mu\text{L}$  of NaOH 3M were immediately added to the samples. Sulfur quantitation was then performed under aerobic conditions using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine, as previously described.<sup>3</sup> For alanine quantification, reactions were stopped by heating the samples at 99°C for 10 min. Denatured proteins were removed by centrifugation and the supernatant was analyzed for its alanine content using alanine dehydrogenase, as previously described.<sup>5</sup> Activity is given as sulfur or alanine molar production per mole of protein complex per minute.

Michaelis-Menten kinetics for the cysteine desulfurase reaction were examined for the complexes in the presence of 10 molar excess of metals. Reaction rates as a function of cysteine concentration were fit to the Michaelis-Menten equation using Kaleidagraph (Synergy Software).

### Iron binding to the complexes

Iron fixation was done under strict anaerobic conditions at 18°C. Purified ternary and quaternary complexes were diluted at a final concentration of 20  $\mu\text{M}$  and were incubated with different excess of  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ). After 1h of incubation, the mixture was desalted using NAP-25 columns (GE Healthcare).

### Iron binding to frataxin

FXN (4 mg/ml) in TNT buffer was incubated with 10 molar excess of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  (aerobically) or  $\text{Fe}^{2+}$  (anaerobically) for 3 hours at 4°C and then desalted on a NAP-25 column (GE Healthcare) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl pH8. Iron-

bound FXN was then loaded onto a Sdx-200 column (GE Healthcare) equilibrated with the same buffer and monomeric fraction of FXN concentrated and analyzed for iron content and UV-visible absorption spectroscopy.

#### Iron-sulfur cluster reconstitution on complexes

Reconstitutions were done under strict anaerobic conditions at 18°C. Purified ternary or quaternary complexes were incubated with a 50 fold excess of DTT, from 2 to 10 fold excess of  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) and reconstitution was initiated by the slow addition of 10 fold excess of L-cysteine at 17°C under anaerobic conditions. After 15 to 240 min. incubation, the mixture was desalted using NAP columns (GE Healthcare). Samples were immediately used for subsequent experiments to avoid degradation upon freezing/thawing.

#### Iron-sulfur cluster transfer to aconitase

Protocol was adapted from Wollers & al.<sup>6</sup> All Fe-S transfer experiments were performed under strict anaerobic conditions at 18°C. GST-mACO2 in its apo-form (0.2 nmol) was incubated in TNT buffer with either a 2.5-fold molar excess of the reconstituted ternary complex (0.5 nmol) or a 1.25-fold molar excess of the reconstituted quaternary complex (0.25 nmol) to provide 5 molar excess of iron with regard to mACO2. Otherwise, 5 molar excess of  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) and sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) were added, and, when mentioned, 10 molar excess of DTT. Cluster transfer to aconitase was allowed for 15 min. The mix was then diluted 10 times in a solution of 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 30 mM citrate, 0.7 mM  $\text{MnCl}_2$ , 50 mM  $\text{NADP}^+$  and 5  $\mu\text{M}$  isocitrate dehydrogenase (IDH) to a final volume of 150  $\mu\text{l}$ . Aconitase activity was indirectly measured for 15 min by monitoring the  $\text{NADP}^+$ -dependent IDH activity at 340 nm.

#### Mass spectrometry

ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) mass spectra were acquired as previously described.<sup>1</sup> The complex samples were diluted in ammonium acetate 100 mM to obtain a final concentration of 20  $\mu\text{M}$  for MS analysis in native condition. The optimal instrumental conditions to observe ternary or quaternized complexes were adapted as

follow: exit voltage respectively at 100 V or at 250 V and data acquisition for 1 or 2 minutes. Before data processing, the spectra were smoothed (Gauss smooth, respectively 0.24 or 0.16 Da). The multicharged mass spectra were then deconvoluted with MaxEnt tool to obtain the molecular weight of the complex.

### Analytical ultracentrifugation

Sedimentation velocity experiments were performed with a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) at 4 °C and 45,000 rpm. The protein radial distributions were observed using absorbance optics at 280 nm and interference optics. Data were collected for complex III (2.5 μM) and frataxin (20 μM) individually in TNT buffer, and a titration series was performed with a constant concentration of complex III (2.5 μM) and increasing concentrations of frataxin (0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 20 and 30 μM corresponding to molar ratio of 1:0.2, 1:0.4, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:12, respectively). Data were deconvoluted to determine sedimentation coefficient distributions using  $c(s)$  analysis in SEDFIT<sup>7</sup> with standard maximum entropy regularization at a confidence level of  $P = 0.68$ . The signal average  $s$ -value of the reaction boundary ( $s_{fast}$ ) as a function of loading concentration was determined by integration of  $c(s)$  between integration limits of experimental  $s_{min} = 4$  S and  $s_{max} = 7$  S to encompass the reaction boundary, but excluding the non-participating species. The dissociation constants were determined by fitting a model for the formation of an association ( $A+B+B \leftrightarrow AB + B \leftrightarrow ABB$ ) to the  $s_{fast}$  isotherm in SEDPHAT.<sup>8</sup> The parameters were refined using initial values of  $S_A = 7.45$  S,  $S_B = 1.95$  S,  $S_{AB} = 8.1$  S and  $S_{ABB} = 8.6$  S. Extinction coefficients of 119 840 and 26 930  $M^{-1} cm^{-1}$  for complex III (component A) and frataxin (component B,) respectively, were calculated based on the amino acid composition.

### Light absorption

UV-visible absorption spectra were recorded on a Cary 1Bio spectrophotometer equipped with optical fibers allowing spectra to be recorded under anaerobic conditions (Varian).

### Electron paramagnetic resonance (EPR)

EPR spectra of reconstituted complexes were recorded at X-band (9.65 GHz) by using a Bruker EMX spectrometer equipped with an Oxford ESR 910 cryostat for low temperature studies. For determination of the spin concentration at  $g = 2$  the system was calibrated against a copper-EDTA sample.

### Mössbauer spectroscopy

A series of  $^{57}\text{Fe}$ -enriched samples of ternary and quaternary complexes (250  $\mu\text{M}$ ) were prepared in the glove box (see table S2) and transferred to a Mössbauer sample holder, and frozen in cooled 2-methyl-butane inside the glove box and kept in liquid nitrogen until the measurement. Mössbauer spectra were recorded at 4.2 K, either on a low-field Mössbauer spectrometer equipped with a Janis SVT-400 cryostat, or on a strong-field Mössbauer spectrometer equipped with an Oxford Instruments Spectromag 4000 cryostat containing an 8T split-pair superconducting magnet. Both spectrometers were operated in a constant acceleration mode in transmission geometry. The isomer shifts are referenced against that of  $\alpha$  metallic iron foil at room temperature. The spectra were analyzed with the program WMOSS (WEB Research, Edina, MN, U.S.A.).

### Statistics

All values are given as the mean +/- SD. Statistical analysis was performed by standard Student T-test.

## Supplementary Results

### *In vivo* formation of ternary and quaternary complexes

Both CplxIII and CplxIV were obtained by co-expression in *E. coli* of murine NFS1, ISD11 and ISCU-His and NFS1, ISD11, ISCU and FXN-His, respectively, as previously described<sup>1</sup>, purified on a cobalt affinity column followed by a gel filtration chromatography (Figure S1A,B). Pure CplxIII eluted as a single peak (161052 Da, Figure S1C) but some monomeric and dimeric forms of ISCU were also observed during the purification process corresponding to uncomplexed HIS-tag ISCU that was retained to the cobalt column (Figure S1A,B). CplxIV eluted as a single peak (189623 Da), and as previously reported, large amount of free monomeric frataxin was also eluted at a mass of about 15 kDa (Figure S1A,B). A quaternary complex can be formed by incubation of pure CplxIII (15  $\mu$ M) and free monomeric frataxin mixed in a 1:10 molar ratio. Indeed, under these conditions, a complex with the same elution profile on native gel to as-purified quaternary complex was formed (Figure S1D). This quaternized complex had an estimated mass of 184788 Da determined by ESI-TOF mass spectrometry analysis, consistent with a 2:4:2:2 stoichiometry (NFS1:ISD11:ISCU:FXN) as for the CplxIV (Figure S1E).

### Analytical ultracentrifugation sedimentation velocities of FXN and CplxIII

When analytical ultracentrifugation (AUC) sedimentation velocity experiments was performed with frataxin alone, a major peak with a corrected sedimentation coefficient  $s_{20,w}$  of 1.95 S was observed, corresponding to a molecular weight (MW) of 15 600 Da in agreement with the calculated MW of 15 274 Da for a monomer (Figure 1C). Upon centrifugation, CplxIII alone was resolved in four main peaks, with  $s_{20,w} = 1.9, 4.5, 6.25$  and 7.45 S (major species). The corresponding MW value of 150 000 Da for the major species is less than the experimental MW determined by mass spectrometry (161 052 Da). This could be due to partial dissociation of CplxIII during centrifugation.

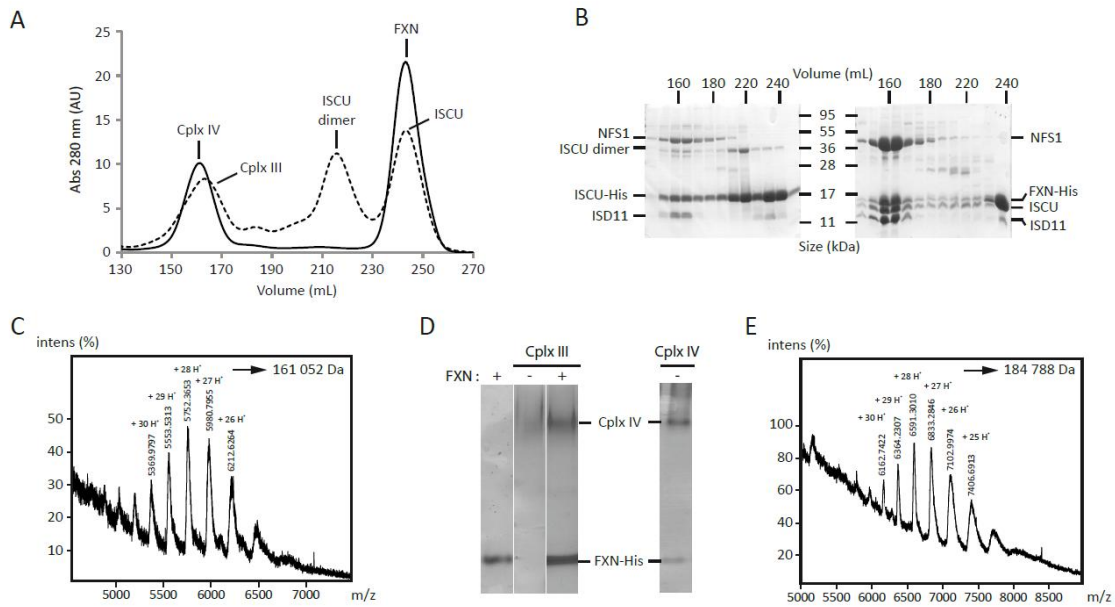
### Time-dependent cysteine desulfurase activity variation of CplxIII and CplxIV

Since CplxIII cannot be frozen and thawed, it was stored at 4°C. CplxIV was treated identically. The cysteine desulfurase activity of both complexes was determined by sulfur quantitation under aerobic conditions using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine as previously described<sup>3</sup> every two days, over 14 days, at 37°C for 10 min using 1 μM complex and 500 μM cysteine (Figure S2B). The  $k_{\text{cat}}$  revealed that CplxIV activity is stable over time (80% of remaining activity after 14 days of storage at 4°C) whereas that of CplxIII decreased rapidly after 8 days of storage at 4°C (30% of remaining activity), showing a stabilizing effect of frataxin on CplxIII cysteine desulfurase activity.

### Iron binding to frataxin

FXN (4 mg) in TNT buffer was incubated with 10 molar excess of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  (aerobically) or  $\text{Fe}^{2+}$  (anaerobically) for 3 hours at 4°C and then desalted on a NAP-25 column equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl pH:8. FXN- $\text{Fe}^{3+}$ , FXN- $\text{Fe}^{2+}$  treated aerobically and FXN- $\text{Fe}^{2+}$  displayed an orange color even though FXN- $\text{Fe}^{2+}$  was less colored than the two other ones. FXN- $\text{Fe}^{3+}$  contained an average of  $2.1 \pm 0.2$  iron/FXN, FXN- $\text{Fe}^{2+}$  treated aerobically  $1.5 \pm 0.15$  iron/FXN and FXN- $\text{Fe}^{2+}$   $1 \pm 0.1$  iron/FXN. From all iron-bound FXN, the monomeric form of FXN recovered after Superdex-200 contained in all cases around 1 iron/FXN ( $1 \pm 0.05$  iron/FXN,  $0.95 \pm 0.05$  iron/FXN and  $0.9 \pm 0.05$  iron/FXN for FXN- $\text{Fe}^{3+}$ , FXN- $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$  and FXN- $\text{Fe}^{2+}$ , respectively) (SI Appendix, Figure S4A). FXN- $\text{Fe}^{3+}$  showed a yellow-orange color and displayed a characteristic UV-visible spectrum with a broad absorption band from 300 to 400 nm, as reported for bacterial frataxin CyaY- $\text{Fe}^{3+}$  (Figure S4).<sup>9,10</sup>





**Figure S1: Purification of ternary and quaternary complexes.** A. Superdex 200 gel-filtration profiles of purified NSF1/ISD11/ISCU-His (CplxIII, dashed line) and NSF1/ISD11/ISCU/FXN-His (CplxIV, solid line) complexes. B. Coomassie-stained SDS-PAGE of CplxIII (left) and CplxIV (right) gel filtrations. Theoretical molecular weights: NSF1 44.5 kDa, ISCU 14.7 kDa, ISCU-His 15.6 kDa, FXN-HIS 15.3 kDa, ISD11 10.8 kDa. C: Native ESI-TOF mass spectrometry analysis of the ternary complex (20  $\mu$ M in ammonium acetate 100 mM). D: Native gel electrophoresis of CplxIII (10  $\mu$ g) mixed with FXN (10 equivalents) leading to the formation of quaternized complex in comparison to as-purified quaternary complex (CplxIV) (10  $\mu$ g). E: Native ESI-TOF mass spectrometry analysis of the quaternized complex (20  $\mu$ M in ammonium acetate 100 mM).

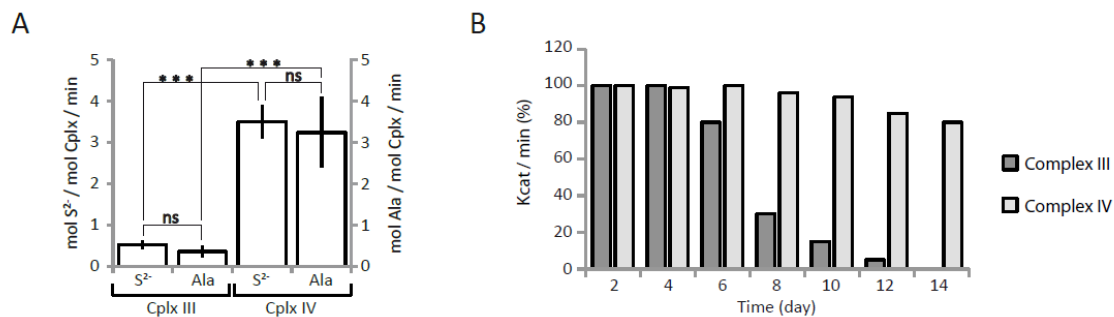


Figure S2: Characterization of the ternary and quaternary complex enzymatic activities. A. Cysteine-desulfurase activities of CplxIII and CplxIV measured by alanine and sulfur quantification. \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: non-significant. B. Cysteine desulfurase activity of CplxIII and CplxIV measured every two days for 14 days with storage of complexes at 4°C.

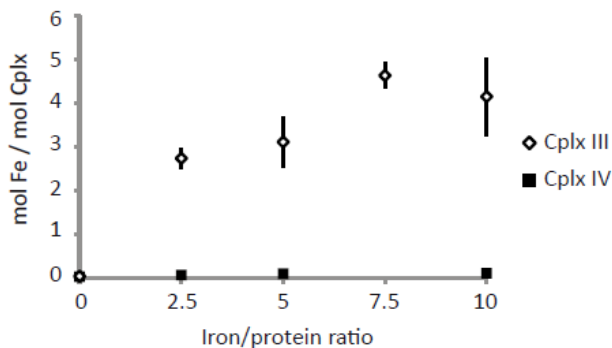


Figure S3: Ternary and quaternary complexes Fe<sup>3+</sup> fixation. Measure of iron content of CplxIII and CplxIV after incubation for 1h with different molar excess of Fe<sup>3+</sup> (FeCl<sub>3</sub>). Adding iron to the ternary complex promoted partial precipitation of the sample.

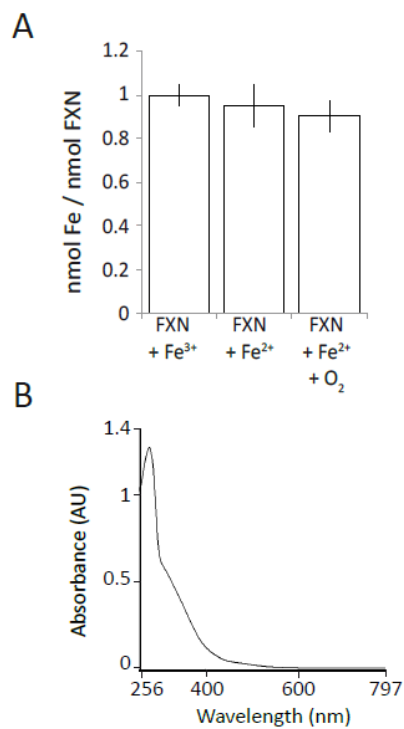


Figure S4: Iron binding to frataxin. A. Measure of iron content in monomeric FXN after incubation with 10 molar excess of Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>/O<sub>2</sub> or Fe<sup>2+</sup> (anaerobically), NAP-25 and Superdex-200. B. UV-visible spectrum of monomeric fraction of FXN (1.2 mg/ml) after incubation with 10 molar excess of Fe<sup>3+</sup> desalting and Superdex-200.

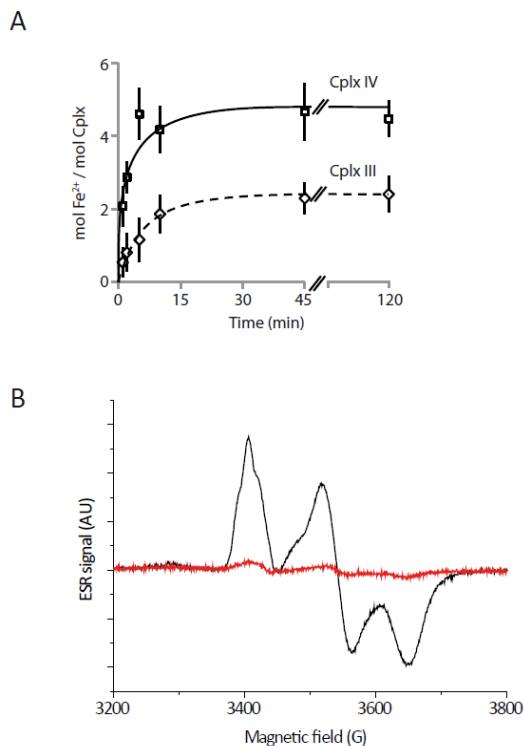


Figure S5: Reconstitution of complexes. A. Iron content of ternary and quaternary complexes over time reconstitution. They were reconstituted as described in methods and iron content was evaluated at different time points after desalting using a bathophenanthroline based colorimetric assay. B. Comparison between CplxIII-R (black) and CplxIV-R (red) EPR spectra recorded with the same conditions (30 K, 0.5 mW microwave power).

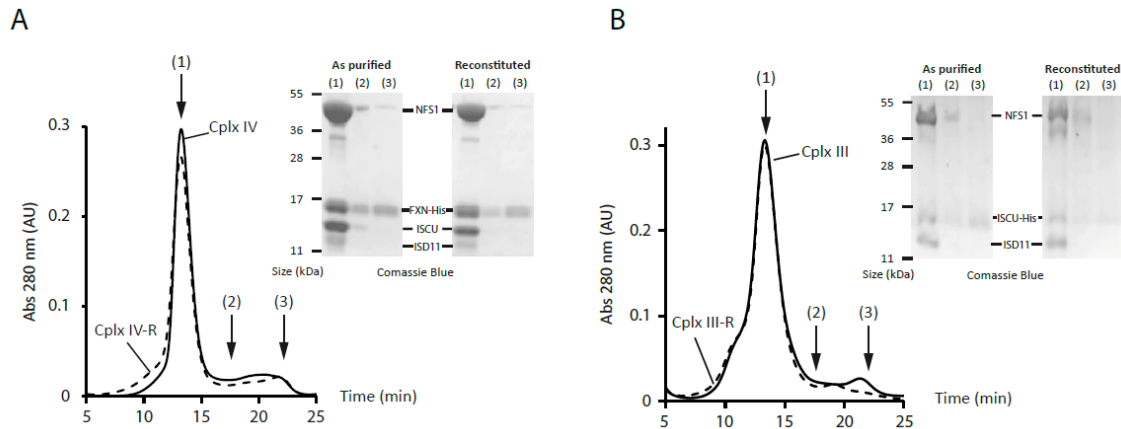


Figure S6: Characterization of CplxIII-R and CplxIV-R complexes. A. Non-dissociation of reconstituted quaternary complex. Superdex-200 gel-filtration profiles of non-reconstituted and reconstituted quaternary complex. Inset: SDS-PAGE Coomassie blue gel of the annotated fractions. B. Non-dissociation of reconstituted ternary complex. Superdex-200 gel-filtration profiles of non-reconstituted and reconstituted ternary complex. Inset: SDS-PAGE Coomassie blue gel of the annotated fractions. A partial precipitation of the ternary complex was visible during Fe-S reconstitution.

	+ Fe <sup>2+</sup>	+ Fe <sup>2+</sup> + L-Cyst
CplxIV	0.29 ± 0.39	3.5 ± 0.10
CplxIV-NFS1 <sub>Cys375&gt;Ala</sub>	0.70 ± 0.10	0.72 ± 0.05

Table S1: Iron content of CplxIV-NFS1<sub>Cys375→Ala</sub> upon cysteine desulfurase activation. Fe<sup>2+</sup>: 10 molar excess; L-cysteine: 10 molar excess; Incubation: 1 hour, 17°C, anaerobically

Mössbauer Sample	Type	Iron excess	Incubation	Iron/Cplx	[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> (%)	[Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> (%)
1	CplxIII-R	2 equ.	1h	1.5	22	0
2	CplxIII-R	4 equ.	4h	1.9	54	7
3	CplxIII-R	5 equ.	15 min	2.5	24	5
4	CplxIII-R	10 equ.	1h	2.4	27	19
5	CplxIV-R	2 equ.	1h	1.6	44	0
6	CplxIV-R	4 equ.	4h	3.5	42	0
7	CplxIV-R	5 equ.	15 min.	3.3	16	0
8	CplxIV-R	10 equ.	1h	5	44	0

Table S2: List of <sup>57</sup>Fe-enriched samples studied by Mössbauer spectroscopy.

## Supplementary References

- (1) Schmucker, S.; Martelli, A.; Colin, F.; Page, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Reutenauer, L.; Puccio, H. *PLoS One* 2011, *6*, e16199.
- (2) Martelli, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Schmucker, S.; Bouvet, S.; Reutenauer, L.; Puccio, H. *Hum. Mol. Genet.* 2007, *16*, 2651.
- (3) Beinert, H. *Anal. Biochem.* 1983, *131*, 373.
- (4) Fish, W. W. *Methods Enzymol.* 1988, *158*, 357.
- (5) Yoshida, A. *Anal. Biochem.* 1965, *11*, 383.
- (6) Wollers, S.; Layer, G.; Garcia-Serres, R.; Signor, L.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 23331.
- (7) Schuck, P. *Biophys J* 2000, *78*, 1606.
- (8) Dam, J.; Velikovskiy, C. A.; Mariuzza, R. A.; Urbanke, C.; Schuck, P. *Biophys. J.* 2005, *89*, 619.





Proteins references	Proteins names	GROUP A : n = 17	Coordination motives references
ACOC_HUMAN:P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase (or IRP1)		Dupuy, J. & al. (2006) Structure 14:129-139
ACON_BOVIN:P20004	Aconitate hydratase, mitochondrial		Lauble, H. & al. (1992) Biochemistry 31:2735-2748
ADX_HUMAN:P10109	Adrenodoxin, mitochondrial		Skjeldal, L. & al. (1991) Biochemistry 30:9078-9083
CISD1_HUMAN:Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET)		Lin, J. & al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:14640-14645
CISD2_HUMAN:Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2		Conlan, A.R. & al. (2009) J. Mol. Biol. 392:143-153
CMAH_MOUSE:Q61419	Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase		Schlenzka W. & al. (1996) FEBS Lett. 385(3):197-200
DHSB_PIG:Q007T0	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial		Sun, F. & al. (2005) Cell 121:1043-1057
DPYD_HUMAN:Q12882	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]		Schnackerz K.D. & al. (2004) Biochim Biophys Acta. 1701(1-2):61-74
ETFD_PIG:P55931	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial		Zhang, J. & al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:16212-16217
GLRX2_HUMAN:Q9NS18	Glutaredoxin-2, mitochondrial		Johansson C. & al. (2007) J Biol Chem. 282(5):3077-82
GLRX5_HUMAN:Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial		Johansson C. & al. (2011) Biochem J. 433(2):303-11
HEMH_HUMAN:P22830	Ferrochelatase, mitochondrial		Crouse, B.R. & al. (1996) Biochemistry 35:16222-16229
MOC51_HUMAN:Q9NZB8	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1		Hänzelmann P. & al. (2004) J Biol Chem. 279(33):34721-32
PR12_HUMAN:P49643	DNA primase large subunit		Weiner, B.E. & al. (2007) J. Biol. Chem. 282:33444-33451
RFESD_MOUSE:Q8K2P6	Rieske domain-containing protein		Levin, E.J. & al. (2008) Acta Crystallogr. D 64:933-940
UCRI_BOVIN:P13272	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial		Iwata, S. & al. (1996) Structure 4:567-579
XDH_HUMAN:P47989	Xanthine dehydrogenase/oxidase		Yamaguchi, Y. & al. (2007) J. Biochem. 141:513-524

Proteins references	Proteins names	GROUP B : n = 15	Coordination motives references
ADO_HUMAN:Q06278	Aldehyde oxidase		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
ADXL_HUMAN:Q6P4F2	Adrenodoxin-like protein, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
CDKAL_HUMAN:Q5VV42	Threonylcarbamoyladenosine tRNA methyltransferase		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
CISD3_HUMAN:POC7P0	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
CK5P1_HUMAN:Q96S26	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
DNA2_HUMAN:P51530	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (from yeast)		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
ELP3_HUMAN:Q9H9T3	Elongator complex protein 3		Paraskevopoulou C. & al. (2006) Mol. Microbiology 59 (3), 795–806
SCSD3_HUMAN:P18074	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
LIAS_HUMAN:O43766	Lipoyl synthase, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
MUTYH_HUMAN:Q9UIF7	A/G-specific adenine DNA glycosylase (MutY)		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
NDUS1_HUMAN:P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
NDUS8_HUMAN:O00217	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
NTHL1_HUMAN:P78549	Endonuclease III-like protein 1		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
PUR1_HUMAN:Q06203	Amidophosphoribosyltransferase (ATase or GPAT)		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
UCRIL_HUMAN:POC7P4	Putative cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity

Proteins references	Proteins names	GROUP C : n = 19	Coordination motives references
AIFM3_HUMAN:Q96NN9	Apoptosis-inducing factor 3		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
DDX11_HUMAN:Q96FC9	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX11		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
DPOD1_HUMAN:P28340	DNA polymerase delta catalytic subunit		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
DPOE1_HUMAN:Q07864	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
DPOLA_HUMAN:P09884	DNA polymerase alpha catalytic subunit		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
DPOLZ_HUMAN:O60673	DNA polymerase zeta catalytic subunit		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
FANCI_HUMAN:Q9BX63	Fanconi anemia group J protein		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
NARFL_HUMAN:Q9H6Q4	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NARFL		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NDUS2_HUMAN:O75306	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NDUS7_HUMAN:O75251	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NDUV1_HUMAN:P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NDUV2_HUMAN:P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NUBP1_HUMAN:P53384	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1 (Nbp35)		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
NUBP2_HUMAN:Q9Y5Y2	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Potential
RSAD1_HUMAN:Q9HA92	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 1, mitochondrial		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
RSAD2_HUMAN:Q8WXG1	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
RTEL1_HUMAN:Q9NZ71	Regulator of telomere elongation helicase 1		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
TYW1B_HUMAN:Q6NUM6	tRNA wybutosine-synthesizing protein 1 homolog B		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable
TYW1_HUMAN:Q9NV66	tRNA wybutosine-synthesizing protein 1 homolog		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : Probable

Proteins references	Proteins names	GROUP D : n = 5	Coordination motives references
ABCE1_HUMAN:P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1 (Rli1)		Karcher A. & al. (2008) J. Biol. Chem. 283:7962-7971
CPIN1_HUMAN:Q6F181	Anamorsin (Ciapin or Dre2)		Zhang Y. & al. (2008) Mol. and Cell. Biology, p. 5569–5582
GLRX3_HUMAN:O76003	Glutaredoxin-3 (PICOT)		Li H. (2012) Biochemistry, 51(8): 1687–1696
RS3_HUMAN:P23396	40S ribosomal protein S3 (RPS3)		Lee C.H. (2002) Mol Cells, 13(1): 154-6
SPY2_HUMAN:O43597	Protein sprouty homolog 2		Unknown, proposal based on the Multiple Alignment

Proteins references	Proteins names	GROUP E : n = 5	Coordination motives references
IREB2_HUMAN:P48200	Iron-responsive element-binding protein 2 (IRP2, not an ISC protein)		Uniprot-Swissprot Database (EBI-EMBL) : By similarity
ISCA1_HUMAN:Q9BU6E	Iron-sulfur cluster assembly 1 homolog, mitochondrial		Unknown, proposal based on the Multiple Alignment
ISCA2_HUMAN:Q86U28	Iron-sulfur cluster assembly 2 homolog, mitochondrial		Unknown, proposal based on the Multiple Alignment
ISCU_HUMAN:Q9H1K1	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial (Scaffold)		Ramelot T.A. (2004), J. Mol. Biol. 344, 567-583
NFU1_HUMAN:Q9UM50	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial (scaffold)		Tong W-H. & al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(17): 9762-9767

## Tableau 5 : Liste initiale des protéines FeS mammifères classifiées

**Groupe A :** signatures connues. **Groupe B :** signatures par similarité. **Groupe C :** signatures potentielles/probables. **Groupe D :** signatures extraites manuellement. **Groupe E :** candidats non-conventionnels.

## II - Recherche et identification de nouvelles protéines FeS mammifères

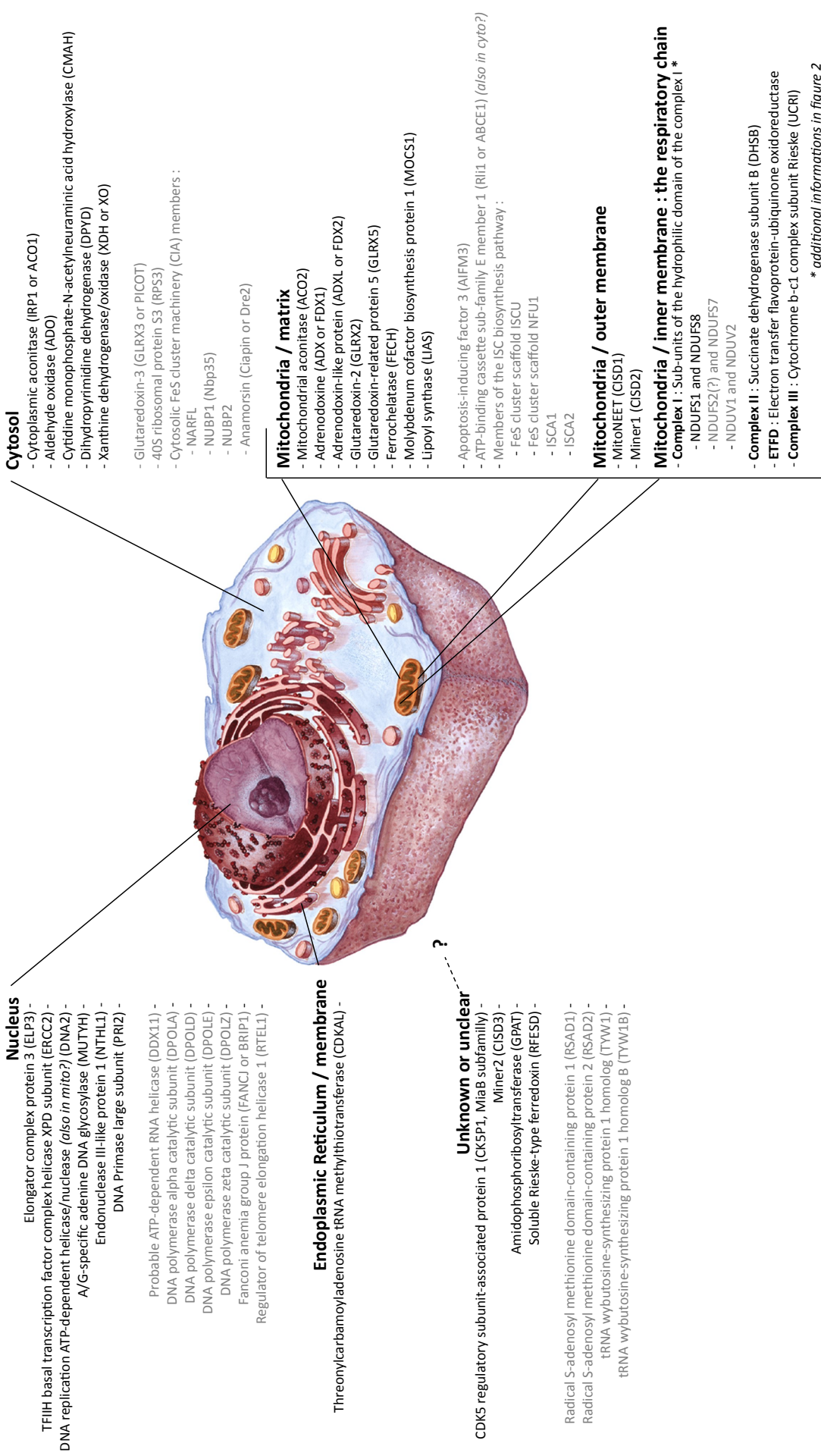
### II.1. Contexte de l'étude

Très tôt après la découverte du gène, les études réalisées sur les biopsies des patients atteints de l'ataxie de Friedreich ont suggéré un déficit des enzymes à clusters FeS mitochondriales (Rötig et al., 1997). Par la suite, de nombreuses études sur différents modèles animaux et cellulaires ont confirmé cette caractéristique physiologique (Martelli et al., 2012). L'hypothèse d'une atteinte plus large, touchant l'ensemble des protéines FeS de la cellule, a été validée dans des modèles souris avec des délétions tissu-spécifique de la frataxine (Martelli et al., 2007). De plus, dans plusieurs de ces modèles, ce déficit a été décrit comme l'évènement primaire (Martelli et al., 2012; Puccio et al., 2001). Il apparaît donc fondamental d'identifier au mieux l'ensemble des protéines FeS afin d'avoir une meilleure compréhension de la maladie.

D'autre part, la frataxine étant ubiquitaire, l'atteinte des protéines FeS est théoriquement générale chez les patients. Or les analyses anatomopathologiques démontrent une atteinte plus précise de certains tissus et types cellulaires du système nerveux central, du système nerveux périphérique, du cœur et du pancréas (Marmolino, 2011). La première hypothèse est que l'instabilité de l'expansion GAA, la mutation majoritaire chez les patients, serait plus importante dans certains tissus que dans d'autres. Ceci entraînerait une diminution plus ou moins importante de l'expression du gène *FXN*, et par conséquent de la quantité totale de frataxine, dans les différents tissus. Une seconde hypothèse postule que certains tissus pourraient être plus sensibles au déficit global des protéines FeS. Cependant il n'est pas invraisemblable que certaines protéines FeS ayant une spécificité tissulaire puissent y contribuer, voire même en être la cause. En plus d'améliorer notre vision d'ensemble, l'identification de nouvelles protéines FeS pourrait alors permettre de tester cette troisième hypothèse.

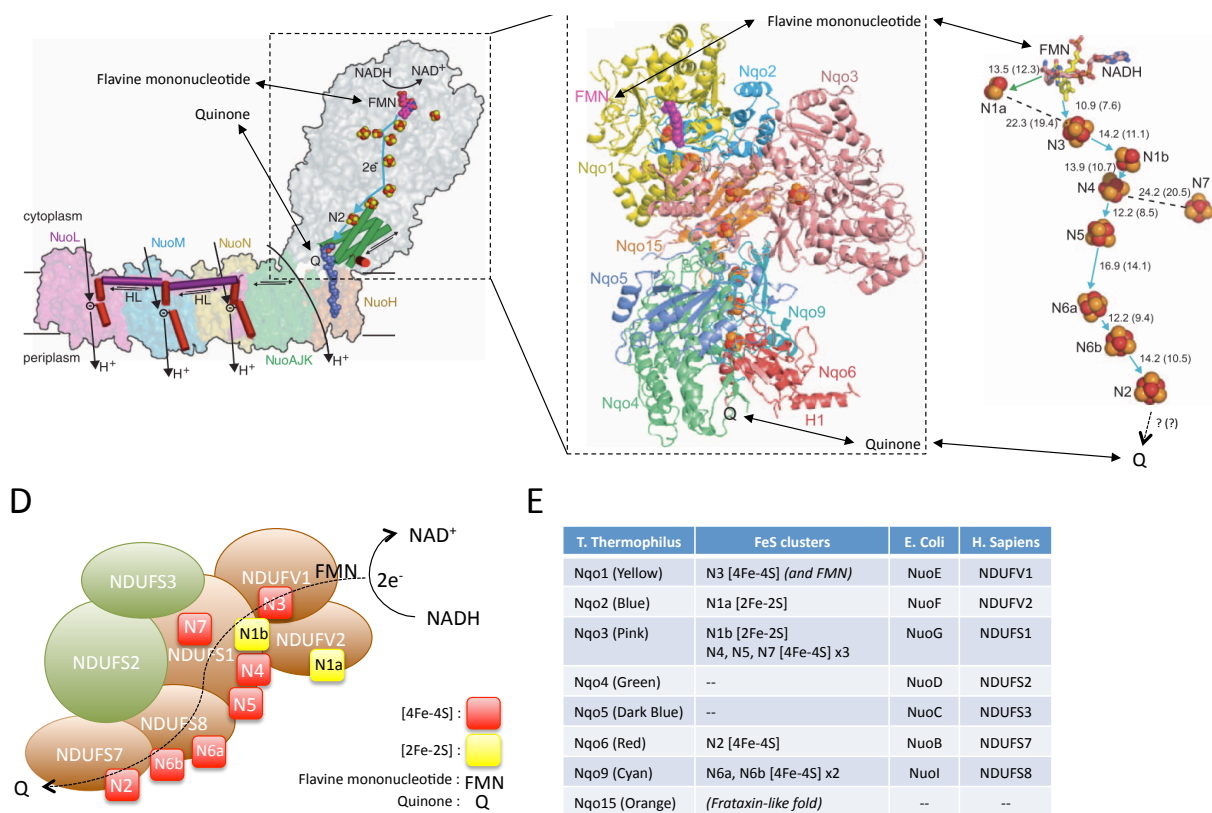
Ce constat fait, il est apparu évident que la connaissance des protéines FeS chez les mammifères était, et est toujours, plutôt réduite. Ainsi, en août 2013, seules 17 protéines étaient réellement caractérisées comme étant des protéines FeS dans cette branche taxonomique (Tableau 5 - A). Un certain nombre peut y être ajouté, par exemple les sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire par analogie fonctionnelle et par conservation des séquences (Figures 35 et 36). Cependant l'étendue des connaissances reste inférieure à celle chez les bactéries (Johnson et al., 2005) ou au mieux, comparable à celle des levures (Lill and Mühlenhoff, 2008).

Ainsi, en l'absence de bases de données dédiées au recensement des protéines FeS potentielles, nous avons entrepris de réaliser nous-mêmes ces recherches. S'est alors posée la question de l'approche.



**Figure 35 : Localisation des protéines FeS mammifères**

Les protéines des groupes de qualités A et B sont indiquées en noir : ces protéines sont démontrées comme contenant des clusters FeS *in vitro* ou ont une très forte probabilité de le pouvoir. Les protéines de groupe de qualité C, D et E sont en gris : ces protéines possèdent vraisemblablement des clusters FeS ou sont atypiques (protéine d'échafaudage par exemple). Les groupes de qualités sont définis dans le texte.



**Figure 36 : Caractéristiques du domaine hydrophile du complexe I de la chaîne respiratoire**

(A) Représentation schématique du complexe I entier chez les procaryotes. (B) Détails structuraux des sous-unités composant son domaine hydrophile, chez *T. Thermophilus*. (C) Chaîne de clusters FeS impliquée dans le transport d'électrons (distance entre les clusters exprimée en Å, de centre à centre (et de bord à bord)), chez *T. Thermophilus*. (D) Représentation schématique du domaine hydrophile chez *H. Sapiens*, obtenue par similarité. (E) Tableau récapitulatif des sous-unités du domaine hydrophile de *T. Thermophilus* (B) avec les clusters FeS et les orthologues chez *E. Coli* et *H. Sapiens*.

(A, B et C sont extraits de Sazanov et al., 2011)



## II.2. Méthodologie et approche pour la prédiction de candidats

Plusieurs approches semblent possibles pour tenter d'identifier de nouvelles protéines FeS candidates. Une partie d'entre-elles sont plus expérimentales, les autres plus informatisées et souvent complémentaires.

### II.2.1. Approches expérimentales

Partant du constat que l'atteinte primaire est une perte de fonctionnalité des protéines à clusters FeS, l'idée qui semblerait la plus adéquate serait de mesurer de manière systématique les « fonctionnalités » de l'ensemble des protéines. Or dans l'état actuel de la recherche, ce type d'idée reste purement conceptuel. Outre le fait que les protéines FeS d'ores et déjà connues sont capables d'avoir un grand nombre d'activités différentes, un certain nombre d'entre-elles ont des clusters FeS qui servent également à d'autres fonctions comme la maturation ou la stabilité de la structure (Johnson et al., 2005). Il n'est donc pas possible, de réaliser ce type de recherche à haut débit. Il est néanmoins intéressant de noter que des approches par spectrométrie Mössbauer et RPE (résonance paramagnétique électronique) ont été faites sur des cellules humaines, et auparavant sur des organismes plus simples, afin de déterminer l'état général du fer dans ceux-ci (Jhurry et al., 2012). Cependant si cette technique, appelée « Iron-ome », permet notamment de quantifier les proportions des différentes formes de clusters FeS, elle ne permet pas d'identifier directement les protéines FeS.

Une autre approche partirait de l'hypothèse d'une atteinte quantitative des protéines FeS. Il s'agit de faire la comparaison du profil d'expression des protéines dans des modèles avec et sans frataxine, par « MudPIT » (Multidimensional Protein Identification Technology). Cette technique qui couple des étapes chromatographiques et des analyses par spectrométrie de masse permet d'obtenir le protéome d'intérêt, c'est-à-dire la liste qualitative et quantitative de protéines de l'échantillon, en l'occurrence des cellules avec et sans frataxine. Le choix de cette approche se base sur le constat qu'en l'absence de leur FeS, certaines apo-protéines peuvent perdre leur stabilité (Haldar et al., 2012). Il est donc envisageable que les protéines exigeant un cluster FeS, notamment pour leur structure, soient affectées. Cette hypothèse est cependant mise à mal par les analyses faites au sein de notre équipe quant aux niveaux d'expression de certaines protéines FeS, notamment la Xanthine Oxydoréductase (XOR ou XDH). En effet, celle-ci ne semble être que peu affectée quantitativement (Martelli et al., 2007). D'autre part, certaines protéines FeS sont parfaitement fonctionnelles en l'absence de leur cluster comme l'aconitase cytosolique (IRP1) (Artymiuk and Green, 2006). Enfin, il est vraisemblable que l'atteinte fonctionnelle des protéines FeS entraîne trop rapidement des dérégulations cellulaires. Ainsi de nombreuses protéines sans cofacteurs FeS pourraient être retrouvées en quantité moindre ou supérieure dans les analyses, constituant un pool de faux

Proteins references	Clusters Types	Hardsigns	Confidence	Improved Softsigns	GROUP A : n = 24
ACOC_HUMAN:P21399	4Fe-4S	C-x(65)-C-x(2)-C	Published	C-x(51,60)-G-x(7)-C-x(2)-C	
ACON_BOVIN:P20004	4Fe-4S	C-x(62)-C-x(2)-C	Published	[GNST]-C-x(57,68)-C-x(2)-C-x-[AG]	
ADX_HUMAN:P10109	2Fe-2S	C-x(5)-C-x(2)-C-x(36)-C	Published	C-x(5)-C-x(2)-C-x(35,37)-C	
CISD1_HUMAN:Q9NZ45	2Fe-2S	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	Published	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	
CISD2_HUMAN:Q8N5K1	2Fe-2S	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	Published	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	
CMAH_MOUSE:Q61419	2Fe-2S	C-x-H-x(18)-C-x(2)-H	Published	C-x-H-x(18)-C-x(2)-H	
DHSB_PIG:Q007T0	2Fe-2S	C-x(4)-C-x(2)-C-x(11)-C	Published	C-x(4)-C-x(2)-[CD]-x(11)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(60)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(55,64)-C	
	3Fe-4S	C-x(46)-C-x(5)-C		C-x(39,48)-[AFWY]-x-C-x(5)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(4)-C-x(52)-C		C-x(2)-C-x(4)-C-x(52)-C	
DPYD_HUMAN:Q12882	4Fe-4S	C-x(38)-C-x(5)-C-x(19)-Q	Published	C-x(38)-C-x(5)-C-x(19)-Q	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C	
ETFD_PIG:P55931	4Fe-4S	C-x(24)-C-x(2)-C-x(2)-C	Published	C-x(23,25)-C-x(2)-C-x(2)-C	
GLRX2_HUMAN:Q9NS18	2Fe-2S per dimer	C-x(84)-C	Published	C-V-x(83)-C-[YH]	
GLRX5_HUMAN:Q86SX6	2Fe-2S per dimer	C	Published	[AFIVY]-x(4,9)-C-[CGPS]-[FHLMWY]-[ACGIPS]-x(2,3)-[AILMTV]-x(2)-[ACILMTV]-[FILP]	
HEMH_HUMAN:P22830	2Fe-2S	C-x(206)-C-x(2)-C-x(4)-C	Published	C-x(204,227)-C-x(2)-C-x(4,6)-C	
MOCS1_HUMAN:Q9NZB8	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C	Published	C-x(3)-C-x(2)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(13)-C		C-x(2)-C-x(13)-C-L	
PRI2_HUMAN:P49643	4Fe-4S	C-x(79)-C-x(16)-C-x(39)-C	Published	C-[AIM]-x(69,81)-C-x(2)-[IM]-x(5,14)-C-x(3,41)-C	
RFESD_MOUSE:Q8K2P6	2Fe-2S	C-x-H-x(20)-C-x(2)-H	Published	C-x-H-x(15,20)-C-x(2)-H	
UCRI_BOVIN:P13272	2Fe-2S	C-x-H-x(16)-C-x(2)-H	Published	C-x-H-x(15,25)-C-x(2)-H	
XDH_HUMAN:P47989	2Fe-2S	C-x(4)-C-x(2)-C-x(21)-C	Published	C-x(2,4)-C-G-x-C-x(11,24)-C	
	2Fe-2S	C-x(2)-C-x(31)-C-x-C		C-x(2)-C-x(31,48)-C-x-C	

Proteins references	Clusters Types	Hardsigns	Confidence	Improved Softsigns	GROUP B : n = 22
ADO_HUMAN:Q06278	2Fe-2S	C-x(4)-C-x(2)-C	By similarity	C-x(4)-C-G-x-C	
ADXL_HUMAN:Q6P4F2	2Fe-2S	C-x(5)-C-x(2)-C-x(36)-C	By similarity	C-x(4,5)-C-x(2)-C-x(29,37)-C	
CDKAL_HUMAN:Q5VV42	4Fe-4S	C-x(35)-C-x(28)-C	By similarity	G-C-x(33,36)-C-x(27,36)-G-C	
	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C		C-x(3)-C-x(2)-C	
CISD3_HUMAN:POC7P0	2Fe-2S	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	By similarity	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	
	2Fe-2S	C-x-C-x(8)-C-x(3)-H		C-x-C-x(8)-C-x(3)-H	
CK5P1_HUMAN:Q96SZ6	4Fe-4S	C-x(35)-C-x(37)-C	By similarity	G-C-x(35,37)-C-x(30,44)-G-C	
	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C		C-x(3)-C-x(2)-C	
DNA2_HUMAN:P51530	4Fe-4S	C-x(256)-C-x(2)-C-x(5)-C	By similarity	C-x(228,256)-C-x(2)-C-x(5)-C	
ELP3_HUMAN:Q9H9T3	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(9)-C-x(2)-C	By similarity	C-P-x(3,8)-C-x(2)-C	
ERCC2_HUMAN:P18074	4Fe-4S	C-x(17)-C-x(20)-C-x(34)-C	By similarity	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x-[EFAQY]	
LIAS_HUMAN:O43766	4Fe-4S	C-x(4)-C-x(5)-C	By similarity	C-x(4)-C-P-x(4)-C	
	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C		C-x(3)-C-x(2)-C	
MUTYH_HUMAN:Q9UIF7	4Fe-4S	C-x(6)-C-x(2)-C-x(5)-C	By similarity	C-x(5,6)-C-x(2)-C-x(5,7)-C	
NDU51_HUMAN:P28331	2Fe-2S	C-x(10)-C-x(2)-C-x(13)-C	By similarity	C-x(10,15)-C-x(2)-C-x-V-x(9,32)-C	
	4Fe-4S	H-x(3)-C-x(2)-C-x(5)-C		H-x(3)-C-x(2)-C-x(5,6)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(43)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(42,46)-C	
NDU58_HUMAN:O00217	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(42)-C	By similarity	C-x(2)-C-x(2)-C-x(42,48)-C	
	4Fe-4S	C-x(28)-C-x(2)-C-x(2)-C		C-x(28,34)-C-x(2)-C-x(2)-C	
NTHL1_HUMAN:P78549	4Fe-4S	C-x(6)-C-x(2)-C-x(5)-C	By similarity	C-x(5,6)-C-x(2)-C-x(5,7)-C	
PUR1_HUMAN:Q06203	4Fe-4S	C-x(145)-C-x(76)-C-x(2)-C	By similarity	C-x(143,151)-C-x(2)-G-x(45,75)-C-x(2)-C	
UCRIL_HUMAN:POC7P4	2Fe-2S	C-x-H-x(16)-C-x(2)-H	By similarity	C-x-H-x(15,25)-C-x(2)-H	

Proteins references	Clusters Types	Hardsigns	Confidence	Improved Softsigns	GROUP C : n = 21
AIFM3_HUMAN:Q96NM9	2Fe-2S	C-x-H-x(16)-C-x(2)-H	Probable	C-x-H-x(16)-C-x(2)-H	
DDX11_HUMAN:Q96FC9	4Fe-4S	C-x(17)-C-x(29)-C-x(34)-C	Probable	C-[ILV]-x(12,19)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-P	
DPOD1_HUMAN:P28340	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(9)-C-x(4)-C	Probable	C-x(2)-C-x(9)-C-x(4)-C	
DPOE1_HUMAN:Q07864	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(11)-C-x-C	Probable	C-x(2)-C-x(11)-C-x(1,2)-C	
DPOLA_HUMAN:P09884	4Fe-4S	C-x(4)-C-x(17)-C-x(2)-C	Probable	[AGLNW]-x(2)-[EIMQRV]-C-x(2,4)-C-x(9,20)-C-x(2,5)-C-x(1,2)-[AFGLY]	
DPOLZ_HUMAN:O60673	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(9)-C-x(4)-C	Probable	[AGLNW]-x(2)-[EIMQRV]-C-x(2,4)-C-x(0,3)-[AILQST]-x(8,17)-C-x(2,5)-C	
FANCI_HUMAN:Q9B6X3	4Fe-4S	C-x(14)-C-x(10)-C-x(38)-C	Probable	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x(4)-[KLR]	
NARFL_HUMAN:Q9H6Q4	4Fe-4S	C-x(46)-C-x(2)-C-x(2)-C	Potential	C-x(31,69)-C-x(2)-C-x(2)-C	
	4Fe-4S	C-x(55)-C-x(148)-C-x(3)-C		C-x(45,74)-P-C-x(143,283)-C-x(3)-C	
NDU52_HUMAN:O75306	4Fe-4S	C-x(5)-C-x(14)-C	Potential	G-x-C-[FY]-x(3,4)-C-x(8,15)-C	
NDU57_HUMAN:O75251	4Fe-4S	C-C-x(63)-C-x(29)-C	Potential	C-C-x(63,64)-C-x(29)-C	
NDUV1_HUMAN:P49821	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C-x(39)-C	Potential	C-x(2)-C-x(2)-C-x(38,40)-C	
NDUV2_HUMAN:P19404	2Fe-2S	C-x(4)-C-x(35)-C-x(3)-C	Potential	C-x(4)-C-x(31,37)-C-x(3)-C	
NUBP1_HUMAN:P53384	4Fe-4S	C-x(13)-C-x(2)-C-x(5)-C	Potential	C-x(13)-C-x(2)-C-x(5)-C	
	4Fe-4S	C-x(18)-C-x(2)-C-x(38)-C		C-x(18)-C-x(2)-C-x(37,40)-C	
NUBP2_HUMAN:Q9Y5Y2	4Fe-4S	C-x(18)-C-x(2)-C-x(2)-C	Potential	C-x(8)-G-x(6,9)-C-x(1,2)-C-x(0,19)-C	
RSAD1_HUMAN:Q9HA92	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C	Probable	C-x(3,11)-C-x-[FY]-C	
RSAD2_HUMAN:Q8WXG1	4Fe-4S-S-AdoMet	C-x(3)-C-x(2)-C	Probable	C-x(3)-C-x(2)-C	
RTL1_HUMAN:Q9NZ71	4Fe-4S	C-x(17)-C-x(8)-C-x(34)-C	Probable	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-[FY]	
TYW1B_HUMAN:Q6NUM6	4Fe-4S-S-AdoMe	C-x(3)-C-x(2)-C	Probable	C-x(3)-C-x(2)-C	
TYW1_HUMAN:Q9NV66	4Fe-4S-S-AdoMe	C-x(3)-C-x(2)-C	Probable	C-x(3)-C-x(2)-C	

Proteins references	Clusters Types	Hardsigns	Confidence	Improved Softsigns	GROUP D : n = 7
ABCE1_HUMAN:P61221	4Fe-4S	C-x(4)-C-x(3)-C	By similarity	C-x(4)-C-x(3)-C-x(3)-C	
	4Fe-4S	C-x(2)-C-x(2)-C		C-x(2)-C-x(2)-C-x(3)-C	
CPIN1_HUMAN:Q6F181	2Fe-2S or 4Fe-4S	C-x(8)-C-x(2)-C-x-C	Probable	C-x(5,15)-C-x(2)-C-x-C	
2Fe-2S pr 4Fe-4S	C-x(2)-C-x(7)-C-x(2)-C	C-x(2)-C-x(7)-C-x(2)-C			
GLRX3_HUMAN:O76003	2Fe-2S (with BolZA)	C	Probable	C-G-F-x(99,240)-C-G	
RS3_HUMAN:P23396	4Fe-4S ?	C-x(21)-C-x(14)-C	Potential	C-x(21)-C-x(13)-G-C	
SPY2_HUMAN:O43597	Unknown	Rich-Cys-Domain	None	C-x(5,14)-C-x(10,15)-C-x(9)-H-C	

Proteins references	Clusters Types	Hardsigns	Confidence	Improved Softsigns	GROUP E : n = 5
IREB2_HUMAN:P48200	No ISC	C-x(65)-C-x(2)-C	None	S-C-x(59,68)-C-x(2)-C	
ISCA1_HUMAN:Q9BUE6	Not yet published	C-x(63)-C-x-C	None	G-C-x(62,68)-C-x-C	
ISCA2_HUMAN:Q86U28	Not yet published	C-x(64)-C-x-C	None	G-C-x(63,64)-C-x-C	
ISCU_HUMAN:Q9H1K1	2Fe-2S or 4Fe-4S	C-x(25)-C-x(42)-C	By similarity	C-x-D-x(21,23)-G-C-x(42,61)-C	
NFU1_HUMAN:Q9UMS0	4Fe-4S (1 per dimer)	C-x(2)-C	Published	G-x-C-x-[GST]-C	

**Tableau 6 : Description des clusters FeS et des motifs de coordination pour les groupes A à E**  
Hardsigns : motifs de base. Improved Softsigns : motifs calculés à partir des alignements multiples.

positifs. Ceci présage donc d'une grande complexité non seulement dans le choix du modèle, dans la fenêtre de prélèvement des échantillons et enfin dans l'analyse des résultats.

L'utilisation des nombreuses données accumulées dans différents modèles et chez les patients suite à des expériences de type microarrays est également envisageable. Cependant, et même si ceci a été observé dans certaines études (Santos et al., 2010), il apparaît que de très nombreux gènes affectés ne soient à l'évidence pas codant pour des protéines FeS (Richardson et al., 2010). De la même manière que pour l'approche par MudPIT, celle-ci serait d'une grande complexité avec la garantie d'un nombre significatif de faux positifs. L'utilisation combinée de données produites dans différents modèles pourraient cependant être source d'informations, ne serait-ce qu'en qualité de filtre, pour affiner une approche bioinformatique.

La coordination des clusters étant faite par des cystéines, certaines approches d'analyse de la réactivité des acides aminés pourraient être utilisées. Une étude datant de 2010 (Weerapana et al., 2010a) a utilisé les propriétés physico-chimiques des cystéines pour les discriminer et ainsi identifier expérimentalement une liste de candidats possédant des cystéines « hyper-réactives ». Cependant, deux importantes limitations sont à constater. Cette approche ne s'est révélée capable de détecter qu'une petite partie des protéines FeS décrites chez les eucaryotes (8 protéines, 13.1% de la liste initiale). De surcroit, il semble qu'aucune corrélation évidente entre la réactivité des cystéines et leur propension à coordonner les clusters FeS ne puisse être établie. En effet, si deux des cystéines impliquées dans la coordination du cluster de l'aconitase mitochondriale ont été identifiées, ce n'est par exemple pas le cas pour ABCE1 pourtant présent dans leur liste (Weerapana et al., 2010a).

## II.2.2 Approches bioinformatiques

L'études des métalloprotéines par bioinformatique est un domaine large où de nombreuses approches sont d'ores et déjà existantes (Marino and Gladyshev, 2012). Le principe de ces approches consiste le plus souvent à retrouver parmi les bases de données accessibles des protéines qui partageraient des caractéristiques structurales ou de séquences typiques des métalloprotéines connues. S'agissant des clusters FeS, la coordination de ces derniers nécessite au moins un résidu cystéine, le plus souvent trois ou quatre, et parfois d'autres résidus additionnels comme l'histidine (Tableau 6). Ces résidus sont très peu présents au sein des séquences protéiques, de 0.5% chez certaines archéobactéries à 2.26% chez les mammifères (Marino and Gladyshev, 2012; Miseta and Csutora, 2000) et permettent donc d'établir des motifs de coordination des clusters FeS caractéristiques. A titre de comparaison, les isoleucines représentent respectivement 4.4% et 4.6% des résidus dans ces deux groupes d'organismes (Miseta and Csutora, 2000). Ces résidus cystéines sont utilisés par des serveurs comme PFAM ou PROSITE, souvent sous la forme de HMM (Hidden Markov Models) ou de motifs, et permettent de retrouver rapidement les membres de la famille proche partageant les mêmes caractéristiques. D'autres serveurs comme FEATURE ou SeqCHED (Passerini et al., 2011) utilisent les informations structurales disponibles ou

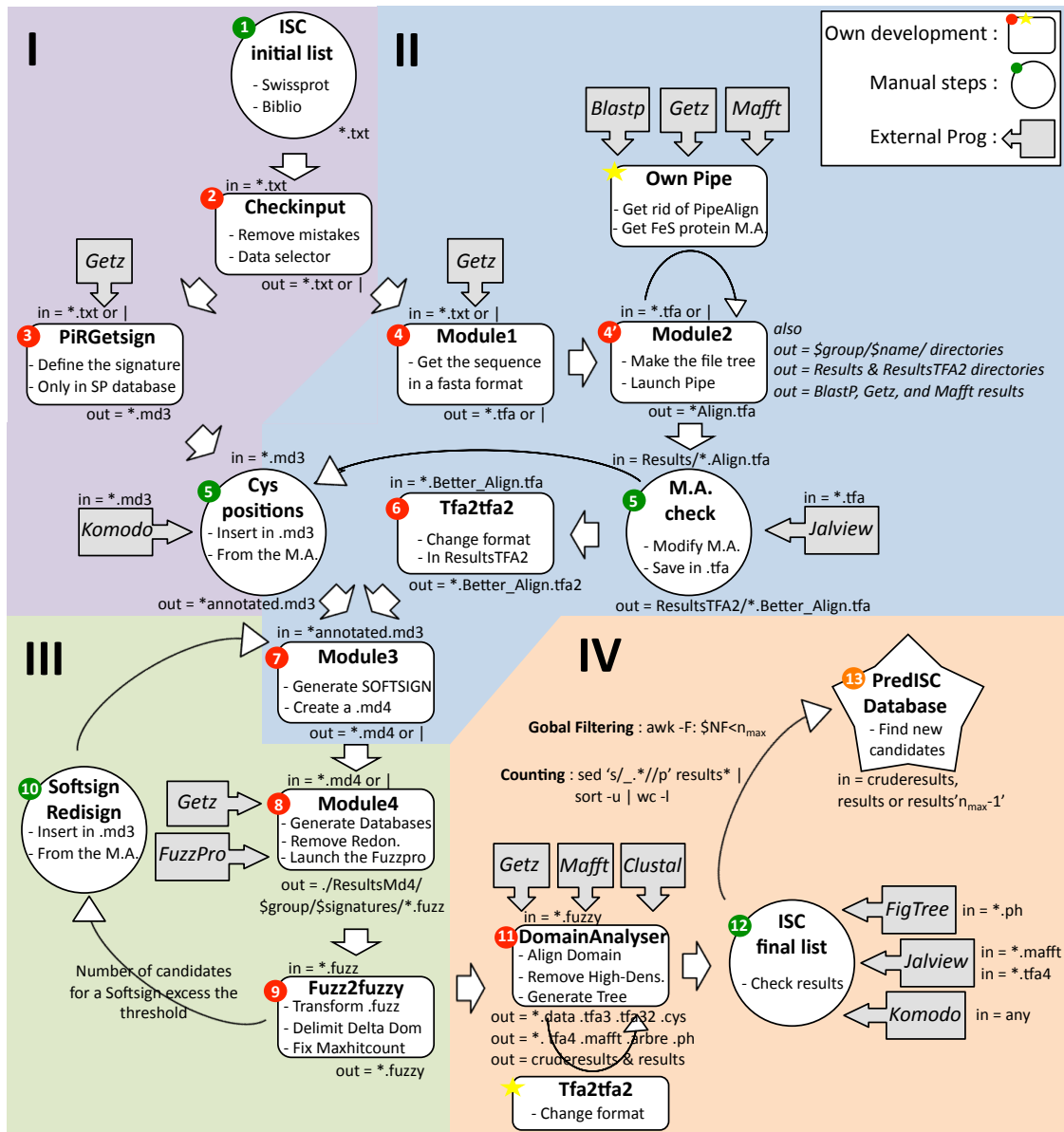
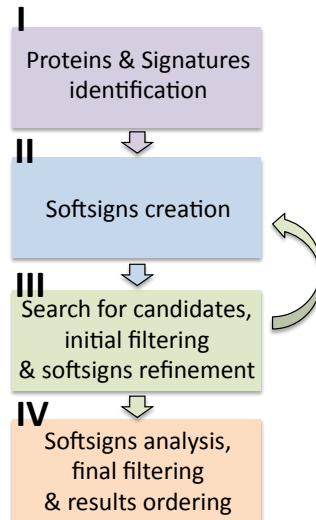




modélisées pour identifier les résidus impliqués dans la coordination des métaux dans des protéines candidates. Si l'utilisation des structures est fonctionnellement plus significative, l'absence de données structurales en masse chez les mammifères nous a imposé l'utilisation des séquences d'acides aminés. Deux méthodes basées sur les séquences sont alors utilisables et complémentaires :

- 1. Partant du constat de la trop haute sélectivité des HMM utilisées par PFAM et de l'absence de l'ensemble des motifs chez PROSITE, nous avons décidé de créer nos propres signatures grâce à un programme que nous appelons PredISC. Ce dernier se base sur les résidus impliqués dans la coordination des clusters, à l'identique des motifs de PROSITE, mais y ajoute de la souplesse afin de correspondre à l'ensemble des orthologues. A titre d'exemple, l'un des motifs de coordination de la xanthine deshydrogénase « C-x(4)-C-x(2)-C-x(21)-C » sera modifié en « C-x(2,4)-C-G-x-C-x(11,24)-C » : les deux dernières cystéines sont séparées par 11 à 24 résidus puisqu'il existe une variation de séquence entre les différentes orthologues. Il utilise ensuite ces motifs pour chercher de nouveaux candidats dans les bases de données de son choix. L'ensemble des détails de cette approche sera décrit par la suite. Le programme PredISC trouve ses limites dans l'étendue parfois réduite des données disponibles, mais également par son incapacité à prédire au delà de ce qui nous lui imposons nous-mêmes subjectivement. D'autres part, les connaissances limitées que nous avons des protéines FeS mammifères nous limitent quant au nombre de motifs pour la recherche de candidats potentiels. Il est à noter cependant que la découverte d'une nouvelle protéine FeS possédant des motifs de coordination inédits peut rapidement être intégrée et ainsi participer à améliorer la qualité de la recherche bioinformatique. Aussi, s'il peut être utilisé seul, d'autres approches complémentaires et radicalement différentes, comme celles citées précédemment, pourraient y être associées et apporter une plus-value.

- 2. Il existe également une seconde approche bioinformatique tout à fait intéressante : le logiciel MetalPredictor. Existant sous une forme simple depuis 2008 (Lippi et al., 2008), une version améliorée (V2.0) du programme a été publiée en 2011 (Passerini et al., 2011). A l'inverse des approches habituelles (conservation de motifs et de structures), le logiciel MetalPredictor calcule la probabilité pour chaque cystéine et histidine d'une séquence d'être, ou non, impliqué dans la coordination d'un métal et de former un pont disulfure. En se basant uniquement sur la séquence d'acides aminés grâce à des profils d'évolutions « position-spécifique », des prédictions structurales et des informations plus générales comme la composition globale en acides aminés et la taille de la protéine (Passerini et al., 2011), ce dernier est capable d'identifier avec une précision atteignant presque les 80% les cystéines impliquées dans la coordination de métaux (Lippi et al., 2008). Bien que non spécifique des clusters FeS, il pourrait être utilisé comme filtre complémentaire afin de corroborer ou non des candidats obtenus par notre propre logiciel PredISC. Il a été d'ores et déjà utilisé en combinaison avec une approche à haut débit sur une collection de protéines purifiées et analysées par spectroscopie aux rayons-X (Shi et al., 2011).



**Figure 37 :** Principe de fonctionnement du programme PredISC  
 En haut, la version synthétique. En bas, une version exhaustive.

## II.3. Méthodes et Résultats

### II.3.1. Le programme PredISC, un logiciel de recherche des signatures FeS

Le programme PredISC est le nom donné à un ensemble de programmes qui fonctionnent en chaîne (Figure 37). Si le principe de son fonctionnement se décrit en 13 étapes (Figure 37 - droite), quatre fonctions majeures le définissent (Figure 37 - gauche):

- (I) L'identification des protéines FeS connues et de leurs motifs de coordination
- (II) La création des « softsigns » (le terme sera défini ci-après)
- (III) La recherche et la filtration des candidats ainsi que le « re-design » des softsigns
- (IV) L'analyse des domaines potentiels de coordination et la création de listes de candidats

Ce programme, développé presque exclusivement en langage « Perl », nécessite au cours de son utilisation à la fois des interventions humaines et l'accès aux programmes et commandes extérieures suivantes :

- « Getz », la commande de questionnement des bases de données.
- « Blastp », logiciel de recherche de similarités de séquences (Plewniak, 2003), qui nécessite l'exécution de la commande 'setpipe', utilisable uniquement sur les serveurs Star.
- « Mafft », logiciel d'alignement multiple (Kato et al., 2002), qui nécessite l'exécution de la commande 'setmafft', utilisable uniquement sur les serveurs Star.
- « Fuzzpro », logiciel de recherche de motifs de la suite EMBOSS, utilisable uniquement sur le serveur Titus.
- « Clustal », logiciel d'alignement et de construction d'arbres (Thompson et al., 2001).

Deux programmes de visualisation sont également indispensables pour voir les alignements multiples et les arbres phylogénétiques. Dans cette étude, nous avons respectivement utilisé « Jalview » et « FigTree » à cette fin, deux logiciels libres et compatibles Mac et PC. Les résultats sont cependant parfaitement compatibles avec la plupart des logiciels existants. Précisons que l'ensemble des résultats et des codes sources du programme sont accessibles sur la clé USB jointe à la thèse. Enfin, il est important de préciser que le programme PredISC ne peut fonctionner en l'état que s'il est exécuté sur un des serveurs Star (ou Titus selon l'étape) de l'IGBMC.

La description des 13 étapes du programme PredISC se divisera en quatre grands chapitres correspondants aux quatre fonctions majeures introduites précédemment.



## A. Identification des protéines FeS connues et de leurs signatures

### A.1. Création de la liste initiale des protéines FeS

Première étape (Figure 37 - Etape I.1.) du programme PredISC, la création de la liste initiale des protéines FeS est un processus semi-automatique qui a nécessité le questionnement de la base de données annotée Swissprot (Utilisation du « Search and Retrieval System » (SRS) à l'Institut Européen de Bioinformatique (EBI), <http://srs.ebi.ac.uk/>) ainsi que des recherches bibliographiques complémentaires sur PubMed (la bibliothèque nationale de médecine des Etats-Unis en ligne, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Le questionnement de Swissprot a été réalisé avec les limites suivantes « taxonomy = 'mammalia' ; keywords = '2Fe-2S | 3Fe-4S | 4Fe-4S' » afin de retrouver l'ensemble des protéines mammifères annotées comme étant des protéines FeS.

Ceci a permis d'établir la liste initiale de 61 protéines FeS que l'on retrouve dans le Tableau 5. Cette table rassemble les protéines par groupes de qualités (A à E, nous expliquerons ce que ceci représente plus bas) et précise leur numéro d'accension, leur nom complet ainsi que l'origine bibliographique ou bioinformatique de leurs motifs de coordination. Bien que la classification automatique des signatures en groupes de qualité soit techniquement finalisée ultérieurement, le fichier informatique utilisé est sous la forme « Groupe de la signature : Numéro d'accension Swissprot : Numéro d'identification Swissprot # Description » comme présenté en exemple dans la bulle ci-dessous. Si des corrections sont nécessaires, notamment quant à la qualification des groupes, elles seront apportées ensuite de manière itérative.

```
D:ABCE1_HUMAN:P61221 # ATP-binding cassette sub-family E member 1 (Rli1 is an ISC)
A:ACOC_HUMAN:P21399 # Cytoplasmic aconitate hydratase
A:ACON_BOVIN:P20004 # Aconitate hydratase, mitochondrial
B:ADO_HUMAN:Q06278 # Aldehyde oxidase
Etc...
```

La seconde étape (Figure 37 - Etape I.2.) est un système automatique de nettoyage du fichier d'entrée appelé « Checkinput » qui permet de le rendre lisible par la suite du programme. Il enlève notamment les commentaires, un certain nombre d'erreurs de frappes courantes, et permet de donner à la suite du programme tout ou partie du fichier d'entrée grâce à un système d'options. L'ensemble des détails concernant le programme et son utilisation est accessible depuis son aide intégrée, commandée comme présenté dans la bulle ci-dessous, ou directement depuis son code source.

```
checkinputv2.1.pl --help
```

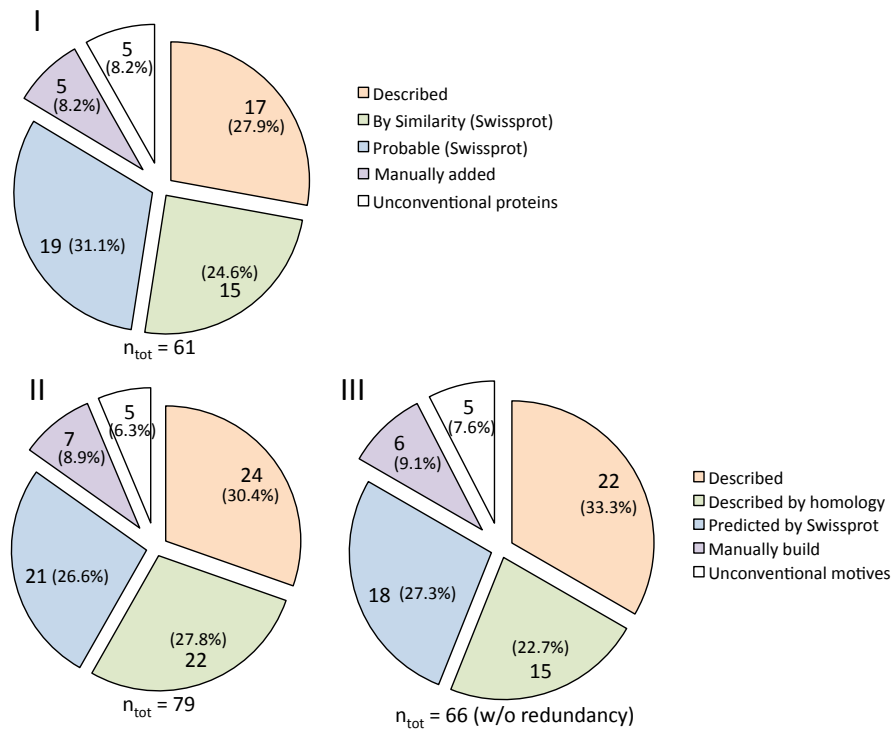


## A.2. Construction et classification qualitative des motifs

La troisième étape (Figure 37 - Etape I.3.) « PiRGestsign » est un système automatique de recherche et de construction des signatures appelées « hardsigns ». Ce nom leur a été donné puisqu'elles sont obtenues à partir d'un unique orthologue de chaque protéine et qu'elles n'ont donc aucune flexibilité (exemple : C-x(2)-C-x(3)-C). Leur format correspond exactement à celui des motifs de PROSITE. Calculées automatiquement par le programme « PiRGestsign » à partir des informations contenues dans la base de données Swissprot, elles représentent le point de départ de la construction et de la classification de chaque signature. C'est grâce à ce programme que nous pouvons rapidement savoir si la signature est « connue », obtenue par « similarité » ou qu'elle est uniquement « potentielle » ou « probable ». Ces quatre termes sont importants et nous permettent de définir une classification qualitative des motifs de coordinations, ou signature (ou encore « hardsigns ») :

- Une signature est dite « connue » si elle est directement déduite d'informations structurales, généralement cristallographiques, et qu'ainsi l'identité de chaque résidus impliqué dans la coordination du cluster FeS ne fait aucun doute. Des expériences couplées de spectroscopie de type Mössbauer et/ou RPE avec de la mutagenèse dirigée sont également considérées ici comme une identification valable d'un motif de coordination. Dans ce cas, et si bien sûr l'étude a été menée sur une protéine mammifère, la « hardsign » et la protéine qui la contient est dite de groupe A, et est donc de la meilleure qualité possible. Nous dénombrons 17 protéines (Tableau 5) et 27 « hardsigns » (Tableau 6) de groupe A.
- Lorsque qu'une signature est obtenue par « similarité », ceci signifie que la preuve de l'identité du motif de coordination a été établie chez un orthologue de la protéine en question, dans notre cas un homologue non-mammifère. Cette annotation est automatiquement extraite depuis la base de donnée Swissprot et nous a permis de définir le groupe B. La qualité est donc moindre dans la mesure où la démonstration expérimentale n'a pas été faite directement chez une protéine mammifère. Nous pouvons cependant considérer ces motifs comme très vraisemblablement bons. Nous dénombrons 15 protéines (Tableau 5) et 22 « hardsigns » (Tableau 6) de groupe B.
- Lorsque qu'un motif est décrit comme « probable » ou « potentiel », annotations également données par la base de donnée Swissprot, ceci signifie que certains indices généralement d'origine bioinformatique suggèrent la présence d'un motif de coordination d'un cluster FeS. Le terme « probable » est décrit comme légèrement plus fort que « potentiel » dans la mesure où il n'est donné que si certaines informations expérimentales viennent corroborer les analyses informatiques. Cependant, si Swissprot est une excellente base de données, la qualité d'annotation sur ce point particulier est parfois contestable, aussi avons-nous regroupé ces candidats dans le groupe C. Nous dénombrons 19 protéines (Tableau 5) et 21 « hardsigns » (Tableau 6) de groupe C.





**Figure 38 : Répartition des candidats et motifs au sein des cinq groupes**  
 (I) Les protéines FeS, (II) les motifs ou hardsigns, (III) les softsigns après optimisation.

Parallèlement à cela, nous pouvons également déduire le type de cluster qui est coordonné puisque les annotations sont faites dans Swissprot. Ces données sont stockées dans le fichier « Hardsign.md3 » dont voici un extrait dans la bulle ci-après. Sont donc indiqués après le signe « > » le groupe de la protéine et de ses hardsigns, puis son numéro d'accession et son numéro d'identification dans la base de donnée Swissprot. A la ligne suivante, sont indiqués le numéro du cluster, son type, la manière dont le motif de coordination a été identifié et la hardsign. Une troisième ligne contient les positions, pour l'instant vide, qui permettront de créer la « softsign ». Nous y reviendrons ensuite.

```
>A:ACOC_HUMAN:P21399 - ACOC_HUMAN
1:(4Fe-4S):(By similarity):C-x(65)-C-x(2)-C
Positions://
>A:ACON_BOVIN:P20004 - ACON_BOVIN
1:(4Fe-4S):C-x(62)-C-x(2)-C
Positions://
Etc...
```

L'ensemble des détails concernant le programme et son utilisation est accessible depuis l'aide intégrée commandée comme indiqué dans la bulle, ou directement depuis son code source.

```
PiRgetsignV8.6.pl --h
```

Il est important de préciser que certains motifs ne sont pas ou mal référencés. Il faut donc parfois retourner directement dans les publications sources pour identifier les résidus importants. Les protéines répondant à ce cas ont été réunies dans le groupe D. Nous dénombrons 5 protéines (Tableau 5) et 7 « hardsigns » (Tableau 6) de groupe D. Il faut noter que nous n'avons jamais pu trouver d'information convaincante permettant d'identifier le motif de coordination d'un FeS dans la protéine Sprouty (Wu et al., 2005). De plus, cette protéine étant extrêmement riche en cystéine, elle sera exclue par les systèmes de filtres du programme, mais nous y reviendrons plus tard.

Enfin, un certain nombre de protéines que nous définirons comme « non-conventionnelles » ont été regroupées dans le groupe E. On y retrouve deux protéines scaffold ISCU et NFU1, qui de part la nature même de leur rôle dans la biosynthèse et le transfert des clusters peuvent être distinguées des autres protéines FeS. On y retrouve également les protéines ISCA1 et ISCA2 qui ont été identifiées comme des protéines FeS (Alain Martelli & Sandrine Ollagnier-de-Choudens, données non-publiées), mais dont nous ignorons le motif de coordination des clusters. Nous retrouvons enfin IRP2, une protéine qui possède un motif typique de coordination de clusters FeS, mais qui n'est expérimentalement pas une protéine FeS. Nous dénombrons 5 protéines (Tableau 5) et 5 « hardsigns » (Tableau 6). La répartition des protéines FeS dans les différents groupes de qualité est résumé dans la figure 38.



## B. Construction des softsigns (Figure 37 - Etape II)

L'étape 4 (Figure 37 - Etape II.4.) consiste en la construction des signatures de type « softsigns », la seconde fonction essentielle du programme PredISC. En opposition avec les « hardsigns », ces signatures seront capables d'être détectées dans l'ensemble des orthologues de protéines FeS de la liste initiale. Pour reprendre l'exemple de l'aldéhyde oxydase précédemment citée, la hardsign suivante « C-x(4)-C-x(2)-C-x(21)-C » est modifiée en la softsign suivante « C-x(2,4)-C-G-x-C-x(11,24)-C ». De ce point de vue, elles ont nettement plus de sens biologiquement. D'un autre côté, elles vont également, par leur flexibilité, pouvoir être reconnues sur nettement plus de candidats. Pour éviter ce problème, il sera parfois nécessaire d'ajouter des résidus non-coordinants, comme c'est le cas dans notre exemple avec une glycine après la seconde cystéine. Nous y reviendrons dans le chapitre suivant, lors de la recherche de candidats et la restructuration des softsigns.

### La construction de ces Softsigns se déroule en trois étapes :

La première étape est complètement automatique et est réalisée par les « Module1 » et « Module2 » (Figure 37 - Etape II. 4 et 4'). Le premier va rechercher les séquences des protéines de la liste initiale dans la base de données Swissprot, le second va réaliser la recherche d'homologues avec « Blast » et les aligner grâce au programme « Mafft ». Cette étape, que l'on voit annotée d'une étoile dorée dans la figure 37 remplace l'utilisation du PipeAlign, un excellent programme développé à l'IGBMC (Plewniak, 2003), ce dernier n'étant hélas plus opérationnel.

Les « Module1 » et « Module2 » sont relativement basiques et utilisés en « pipe », c'est à dire en chaine en langage informatique. Ils ne possèdent donc pas d'aide intégrée, mais de nombreuses annotations ont été réalisées dans son code source. Il est à noter cependant que le « Module2 » nécessite des options telles qu'une base de données (-data=\$) où il pourra faire ses recherches, ainsi que le nombre maximum de candidats à aligner (-max=#) après le « Blast ». Nous avons réalisé notre recherche ainsi :

```
checkinputv2.1.pl | Module1v2.1 | Module2v5.0 -data=swissprot.tfa -max=200
```

Une arborescence complexe est créée par le « Module2 » pour stocker l'ensemble des fichiers produits lors de cette étape. Nous ne rentrerons pas ici dans les détails techniques mais il est cependant important de retenir que l'ensemble des alignements multiples sont finalement copiés dans un dossier « /ResultsTFA2 », une étape importante pour la suite de la construction des softsigns.

Dans un second temps, l'ensemble des alignements multiples ainsi produits va être analysé et retraité manuellement pour les 61 protéines de la liste initiale (Figure 37 - Etape II.5.). Les alignements multiples corrigés sont ré-enregistrés dans le dossier « /ResultsTAF2 » et sont accessibles sur la clé USB jointe à la thèse. De ces alignements multiples seront



extraites les positions précises des résidus coordonnant les clusters FeS. Ces données seront ajoutées au fichier « Hardsign.md3 » qui sera renommé « HardsignCorrected.md3 » dont voici un extrait dans la bulle ci-dessous. On retrouve donc à la suite du signe « > » le numéro d'accession et les autres références de la protéine. A la ligne suivante, on retrouve les informations de base concernant le motif, c'est-à-dire : son numéro, le type de cluster coordonné, l'origine de la signature et la signature elle-même. A la troisième ligne sont désormais indiquées les positions dans l'alignement multiple des résidus de la signature. C'est à partir de ces informations que la création de la softsign sera ultérieurement possible.

```
>A:ACOC_HUMAN:P21399 - ACOC_HUMAN
1:(4Fe-4S):(By similarity):C-x(65)-C-x(2)-C
Positions:793:864:867
//
>A:ACON_BOVIN:P20004 - ACON_BOVIN
1:(4Fe-4S):C-x(62)-C-x(2)-C
Positions:790:861:864
//
Etc...
```

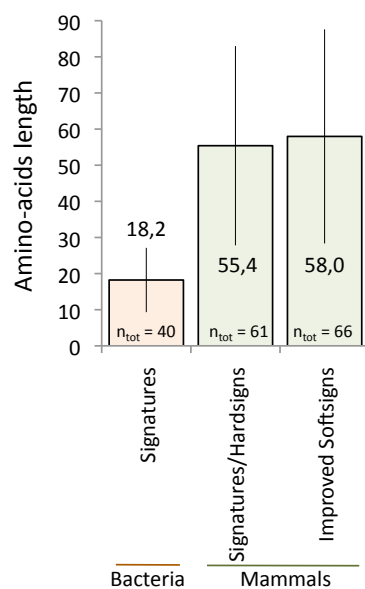
Dans un troisième temps, et ceci est plus anecdotique biologiquement, le logiciel « Tfa2tfa2V2.2.pl » (Figure 37 - Etape II.6.) va être exécuté pour modifier la présentation des fichiers d'alignements multiples et ainsi permettre la création de fichiers compatibles avec notre programme.

Ensuite, et c'est le point important, le « Module3 » (Figure 37 - Etape II.7.), qui nécessite à la fois les informations contenues dans le fichier « HardsignCorrected.md3 », dont on voit un fragment ci-dessus, et les alignements multiples situés dans le dossier « /ResultsTAF2 » va automatiquement construire les softsigns. L'utilisation du « Module3 » étant relativement simple, aucune aide intégrée n'y a été ajoutée. Mais, comme les précédents modules, il a été extensivement annoté au niveau de son code source si nécessaire. L'exécution de cette étape se fait ainsi avec ces deux programmes en pipe, avec en option le fichier d'entrée (--in=) et de sortie (--out=) :

```
Tfa2tfa2V2.2.pl | Module3V3.3.pl --in=HardsignCorrected.md3 --out=Softsign.md4
```

Les informations seront donc écrites dans le fichier « Softsign.md4 » dont un extrait est visible dans la bulle ci-dessous. Le schéma du fichier est identique à l'exemple précédent à la différence près qu'une quatrième ligne a été automatiquement insérée et qu'elle contient le texte « SoftSign » suivi de la softsign calculée.

```
>A:ACOC_HUMAN:P21399 - ACOC_HUMAN
1:(4Fe-4S):(By similarity):C-x(65)-C-x(2)-C
Positions:793:864:867
```



**Figure 39 :** Longueur moyenne des motifs de coordination des clusters FeS chez les bactéries et les mammifères

```
SoftSign:C-x(59,68)-C-x(2)-C
//
>A:ACON_BOVIN:P20004 - ACON_BOVIN
1:(4Fe-4S):C-x(62)-C-x(2)-C
Positions:790:861:864
SoftSign:C-x(57,68)-C-x(2)-C
//
Etc...
```

Il s'agit ici d'une des étapes majeures du programme. En effet, la création de l'ensemble des softsigns clôt les deux premières grandes étapes (I et II) du programme PredISC et annonce la recherche des candidats. Il faut remarquer cependant qu'il existe une boucle dans l'étape 3 (Figure 37) dans le cas où la softsign calculée serait trop permissive et entrainerait un nombre trop important de « hits », c'est à dire de candidats potentiels. Ce problème sera par exemple extrêmement important pour les glutaredoxines qui ne coordinent les clusters qu'avec une ou deux cystéine(s). Des améliorations seront alors apportées à la softsign mais nous y reviendrons dans le chapitre suivant.

L'ensemble des softsigns, dans leur état final, est accessible dans le Tableau 6. Il est tout à fait intéressant de constater que d'une manière générale la taille des motifs de coordination chez les mammifères est nettement plus grande que celle chez les bactéries (Figure 39).

## C. Recherche et filtration des candidats, amélioration des Softsigns

### C.1. Traitement des Softsigns et recherche des candidats

Début de l'étape III, et annoté d'un numéro 8 dans la figure 37, le « Module4 » a deux fonctions principales. La première est de traiter l'ensemble des softsigns afin d'enlever la redondance, et la seconde est de rechercher les candidats par l'intermédiaire du logiciel « Fuzzpro ».

- Certains motifs typiques sont retrouvés dans différentes protéines. C'est le cas par exemple avec le motif des SAM-radical « C-x(3)-C-x(2)-C ». Afin d'éviter de faire plusieurs recherches avec les mêmes softsigns, le « Module4 » va non seulement trier mais également supprimer les softsigns qu'il a déjà vues. Il va cependant le faire en respectant la « qualité » des softsigns : en effet, si l'on prend le précédent exemple du motif « C-x(3)-C-x(2)-C », celui-ci est présent dans MOCS1 une protéine du groupe A, mais également dans la lipoyl synthase qui est du groupe B ou encore dans la tRNA wybutosine du groupe C (Tableau 6). Aussi dans ce cas, le « Module4 » considèrera qu'elle est du groupe A et ne fera qu'une seule recherche de candidats avec cette softsign. Le nombre total de softsigns non-redondantes est de 66 (Figure 38).





- Dans un second temps le « Module4 » va exécuter la recherche de candidats dans la base de données de choix. Dans notre cas, nous nous sommes limités à la base Swissprot\_Mammals afin de limiter la masse d'informations à traiter et de concentrer notre attention sur la famille d'organismes qui intéresse plus particulièrement le laboratoire.

L'exécution du programme se fait en donnant en option (--data=) une base de données ainsi que le fichier « softsign.md4 » précédemment produit par le « Module3 » comme indiqué dans la bulle ci-après.

```
Module4v2.9.pl --data=SW_MAMMALS Softsign.md4
```

Une option permet de vérifier si la redondance des softsigns est correctement traitée :

```
Module4v2.9.pl --nofuzz Softsign.md4
```

Enfin l'aide est accessible en exécutant les commandes suivantes ou en accédant directement au code source annoté.

```
Module4v2.9.pl --help
```

```
Module4v2.9.pl --doc (Aide plus détaillée)
```

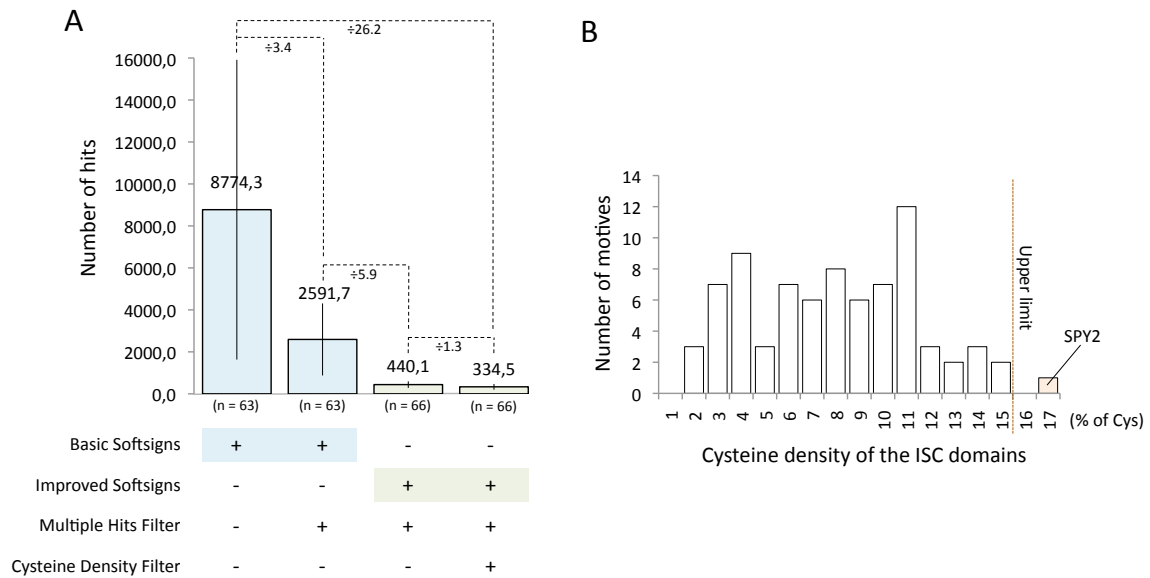
L'ensemble des résultats des recherches est enregistré dans un dossier « /ResultsMd4 », en suivant une arborescence intuitive basée sur les groupes de qualité et les noms des softsigns. Ces informations sont également disponibles sur la clé USB jointe. Cependant, les résultats du logiciel « Fuzzpro » enregistrés au format « .fuzz » sont extrêmement compliqués à traiter en l'état. Aussi, une modification importante des données va être effectuée afin de pouvoir filtrer, quantifier et, au besoin, redéfinir des softsigns trop permissives.

## C.2. Systèmes de filtration et d'amélioration de la qualité du jeu de données

### C.2.1. Le programme Fuzztofuzzy

Annoté étape 9 sur la [figure 37](#), le programme « Fuzztofuzzy » a plusieurs fonctions. La première est biologiquement anecdotique et permet de transformer les résultats du logiciel « Fuzzpro » en données plus facilement traitables au format « .fuzzy ». Il a cependant deux autres fonctions nettement plus importantes :

- Le programme « Fuzztofuzzy » permet de délimiter les bornes du « domaine » de coordination du cluster, qui englobe la séquence protéique contenant la softsign plus un nombre de résidus de chaque côté. Nous avons choisi de considérer les dix résidus de chaque côté de la softsign, mais ceci est en option (--delta=#) comme indiqué dans la bulle ci-dessous. Ceci doit cependant être fait avec d'autant plus d'attention qu'il n'est pas rare que certains domaines se situent aux extrémités de protéines. Dans un



**Figure 40 : Filtres appliqués aux Softsigns ou aux domaines protéiques contenant les motifs potentiels de coordination des clusters FeS**

(A) Mesure de l'efficacité des différents filtres (l'effet combiné divise par plus de vingt-six le nombre de hits par Softsigns). (B) Mesure de la densité des cystéines des domaines de coordination des clusters des protéines FeS initiales (La limite sera établie à 15%). *SPY2* : *Sprouty*, *ISC* : *Iron-Sulfur Clusters*.

tel cas, le programme « Fuzztofuzzy » le remarque et adapte les bornes afin de ne pas dépasser les dimensions réelles des protéines.

- Le programme permet également d'appliquer l'un des tout premiers filtres : le nombre maximum de « hits » dans une même protéine pour une même softsign. Cette option (`--maxhitcount=#`) permet de limiter ce nombre, et pour des raisons purement biologiques nous l'avons défini à 2 : seuls CISD3 et la dihydropyrimidine deshydrogénase (DPYD) possèdent deux fois les mêmes motifs de coordination pour deux de leurs clusters FeS ([Tableau 6](#)). L'existence d'une protéine FeS avec trois motifs de coordination identiques semble peu probable en l'état actuel des connaissances. L'efficacité d'un tel filtre est significative, puisqu'il permet de diviser d'un facteur 3.4 le nombre de candidats par softsign ([figure 40 - A](#)).

- Enfin, le programme permet de compter précisément le nombre de candidats pour chaque softsign et ainsi améliorer la qualité de ces dernières. L'information se trouve à la fin de chaque fichier \*.fuzzy et peut informatiquement être facilement extraite.

Le programme s'exécute donc de la manière suivante :

```
Fuzz2fuzzyv1.3.pl --delta=10 --maxhitcount=2
```

Le programme possède une aide qui se commande ainsi :

```
Fuzz2fuzzyv1.3.pl --help
```

```
Fuzz2fuzzyv1.3.pl --doc (Aide plus détaillée)
```

### C.2.2. Le « re-design » des softsigns

Annoté étape 10 sur la [figure 37](#), le « re-design » d'un certain nombre de softsigns est une étape manuelle qui est apparue comme clairement indispensable. En effet comme précédemment dit, certaines softsigns doivent être retravaillées ; le cas de la protéine GLRX5 en est le parfait exemple. Dans la mesure où une seule cystéine est nécessaire à cette protéine pour coordonner un cluster (certes avec l'aide d'une autre GLRX5 et du glutathion *in vitro*), nous avons été obligés d'ajouter des résidus spécifiques de la GLRX5 afin d'éviter de décrire toutes les protéines possédant une cystéine dans leurs séquences, c'est-à-dire quasiment l'ensemble des protéines de la database Swissprot\_Mammals, comme de potentielles protéines FeS.

Pour des raisons techniques inhérentes à l'étude des domaines de coordination dont nous parlerons dans la prochaine partie, nous avons donc imposé une limite maximale de 1000 hits par softsigns après « re-design ». Ces softsigns retravaillées sont celles présentées dans le [Tableau 6](#) (et dans les statistiques de la [figure 38](#)). Ceci permet d'ailleurs de constater que dans l'exemple de la GLRX5, la softsign est désormais extrêmement complexe ([Tableau 6](#)). Ceci a cependant permis de réduire considérablement le nombre de candidats puisqu'il est



divisé par un facteur 5.9 (Figure 40). A ce titre, le re-design est une véritable étape de filtrage des résultats.

Techniquement, les modifications sont donc apportées au fichier « HardsignCorrected.md3 » afin de pouvoir relancer le « Module3 » comme montré dans la figure 37. Les alignements multiples précédemment stockés dans le dossier « /ResultsTFA2 » sont réutilisés pour faire le choix des acides aminés ne coordonnant pas le cluster à ajouter à la softsign. Nous nous sommes systématiquement concentrés sur ceux qui étaient le plus significativement conservés.

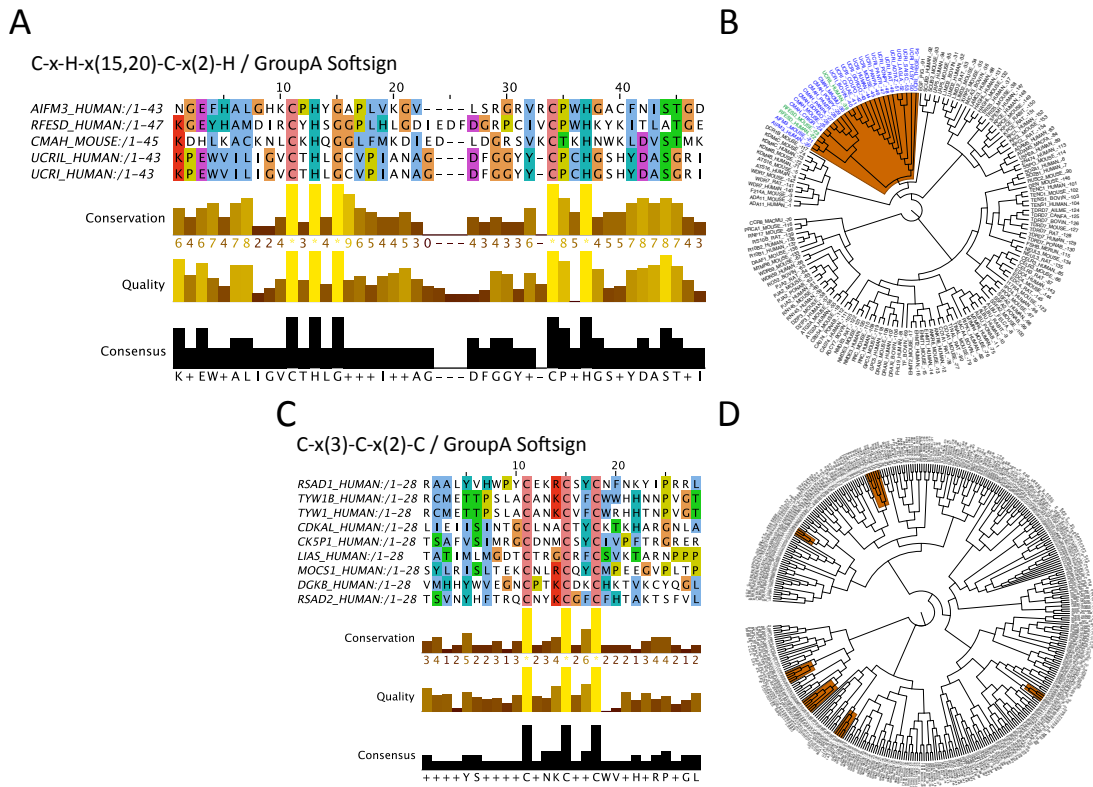
Il est à noter cependant que l'utilisation d'HMM (Hidden Markov Models), et donc d'un possible moyen de pouvoir établir un score de « ressemblance » pour chaque candidat, aurait peut-être pu simplifier cette étape. En effet, à l'inverse du logiciel « Fuzzpro » qui ne permet que de dire si oui, ou non, le motif existe dans une protéine, nous aurions pu imposer la récupération des 1000 candidats ayant les meilleurs scores, évitant des étapes manuelles de re-design. Cependant, l'utilisation du programme « Fuzzpro » nous permet de contrôler précisément ce que nous recherchons, en concentrant nos efforts sur les motifs de coordination et pas nécessairement sur le domaine en lui-même. D'autre part, la quatrième fonction majeure du programme PredISC (Figure 37) que nous allons désormais décrire permettra de reconsidérer ensuite les domaines contenant les motifs de coordinations.

## **D. Analyse et filtration des domaines contenant les Softsigns**

### *D.1. Le système d'analyse des domaines*

Annoté étape 11 sur la figure 37 et dernière fonction importante du programme PredISC, l'analyse des domaines contenant les clusters FeS a pour vocation de donner des informations complémentaires aux futurs utilisateurs du programmes ou aux scientifiques consultant les résultats. Le programme « DomainAnalyser » a plusieurs fonctions :

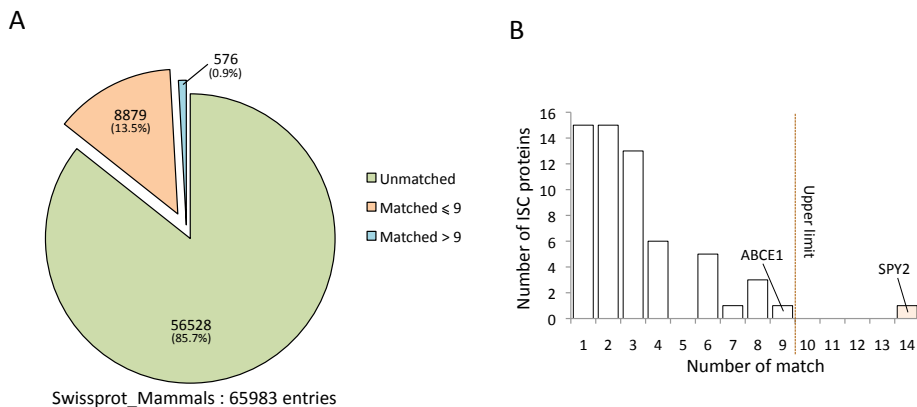
- Le programme utilise les informations que lui fournit le programme « Fuzztofuzzy » afin d'extraire depuis la base de données de choix, ici Swissprot\_Mammals, les domaines contenant les softsigns, et ceci pour l'ensemble des candidats. Il mesure alors systématiquement la densité de cystéines des domaines qu'il récupère, ce qui nous sert de filtre. En se basant sur les densités de cystéines dans les domaines des protéines FeS de notre liste initiale (Figure 40 - B), nous avons défini un seuil à 15%. Ceci a permis de faire diminuer le nombre de candidats par softsign de presque 30% (Figure 40 - A). Nous pouvons cependant modifier la valeur seuil grâce à l'option « --maxcys=# ».
- Le programme crée ensuite, grâce au logiciel « mafft », des alignements multiples des candidats possédant les mêmes softsigns, en n'utilisant bien entendu que le domaine qu'il a précédemment extrait et contenant le motif de coordination du cluster FeS. La limitation à 1000 candidats par softsigns s'explique ici puisqu'il devient presque impossible de réaliser un alignement multiple dès lors qu'on dépasse ce seuil avec « mafft ». Ceci peut cependant être modifié grâce à l'option « --maxhit=# ».



**Figure 41 : Alignements multiples et phylogénie des domaines contenant les Softsigns**

(A) Alignement multiple des 5 protéines FeS contenant le motif 'C-x-H-x(15,20)-C-x(2)-H'. (B) Arbre phylogénétique "concentré" de l'ensemble des candidats présentant le motif "C-x-H-x(15,20)-C-x(2)-H". (C) Alignement multiple des 9 protéines FeS contenant le motif "C-x(3)-C-x(2)-C". (D) Arbre phylogénétique "dispersé" de l'ensemble des candidats présentant le motif 'C-x(3)-C-x(2)-C'.

(Les arbres sont calculés uniquement sur les domaines contenant les Softsigns, plus un delta de -10/+10. Les alignements multiples ne représentent qu'un seul orthologue de chaque protéine).



**Figure 42 : Résultats pour la recherche dans Swissprot\_Mammals**

(A) Nombre total de hits après utilisation de l'ensemble des filtres appliqués aux Softsigns, aux domaines ainsi qu'aux résultats bruts (filtre global). Avec 8879 hits, 13.5% des protéines de la base de données sont considérés comme de potentiels candidats. (B) Etablissement du filtre global : nombre maximum de softsigns détectées pour chaque protéines FeS de la liste initiale. La limite est donc établie à 9 afin de pouvoir conserver l'ensemble des candidats d'entrée, à l'exception de Sprouty (SPY2). *ABCE1* : ATP-binding cassette, sub-family E, member 1, *ISC* : Iron-Sulfur Clusters.

Il est important de remarquer dans le cas présent que nous alignons des domaines qui n'ont généralement strictement rien à voir du point de vue de l'évolution. Mais il s'avère que pour certains types de softsigns, la conservation du domaine va au delà des cystéines permettant la coordination. L'exemple est illustré par la [figure 41](#) où nous avons extrait des alignements globaux les protéines FeS de la liste initiale, permettant ainsi une lecture plus facile. [Figure 41 - A](#), le motif C-x-H-x(15,20)-C-x(2)-H présente une conservation importante du domaine de coordination du cluster FeS, qui va au delà des cystéines et de l'histidine. A l'inverse, [figure 41 - C](#), le motif C-x(3)-C-x(2)-C semble être le seul point commun entre les domaines, à l'exception du résidu cyclique avant la dernière cystéine.

Ainsi, il apparaît vraisemblable que, tout du moins dans certains cas, la ressemblance au delà des résidus coordonnant le cluster puisse nous aider à trouver plus facilement des candidats qui auraient un plus grand intérêt. D'autre part, un tel système nous permet de vérifier facilement si notre protéine d'intérêt partage plus que le motif de coordination. L'ensemble des alignements est disponible dans le dossier « /ResultsMd4/\*.mafft ». De manière complémentaire, un arbre a été produit par Neighbors-Joining, grâce au logiciel « clustal ». Ceci permet de définir plus intuitivement les limites entre les différents candidats non-homologues en se basant sur la similarité de séquence. Ainsi l'exemple présenté dans la [figure 41](#) est clairement schématisé par l'arbre concentré en [figure 41 - B](#), ou éclaté en [figure 40 - B](#).

- Enfin, le programme réunit l'ensemble des résultats pour chaque softsigns afin de créer une première liste contenue dans le fichier « results.txt ». Cette liste contient donc les « hits » pour l'ensemble des différentes espèces, dans notre cas les mammifères. Ceci représente 9455 hits ([Figure 42](#) : ensemble des « matched ») soit un peu plus de 14.3% de la base de données Swissprot\_Mammals. Le fichier se présente ainsi : le numéro d'accèsion, le qualité de la softsign détectée (A à E), identité de la softsign et enfin nombre total de softsigns détectées. Si plusieurs softsigns ont été détectées, elles sont listées par ordre de qualité, de A à E, sur la même ligne comme c'est le cas ci-dessous pour AIFM3\_HUMAN.

```
AHI1_RAT:D:C-G-F-x(99,240)-C-G:1
AHRR_HUMAN:E:G-C-x(62,68)-C-x-C:1
AIFM3_HUMAN:A:C-x-H-x(15,20)-C-x(2)-H:A:C-x-H-x(15,25)-C-x(2)-H:C:C-x-H-x(16)-C-x(2)-H:3
Etc...
```

Le programme « DomainAnalyser » est exécuté avec les options de densité de cystéines et le nombre maximum de candidats à aligner pour une softsign comme indiqué ci-dessous.

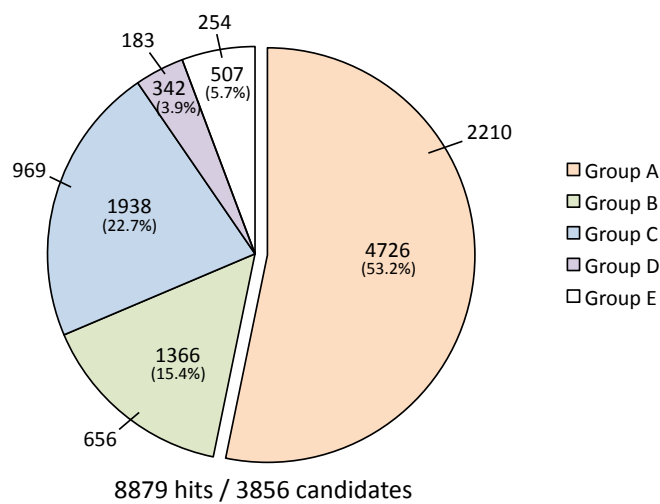
```
DomainAnalyserV2.0.pl --maxcys=15 --maxhit=1000
```

Un système d'aide intégré est disponible.

```
DomainAnalyserV2.0.pl --help
```

```
DomainAnalyserV2.0.pl --doc (Aide plus détaillée)
```





**Figure 43 : Résultats détaillés de la recherche des motifs sur Swissprot\_Mammals**

Le nombre de hits (toutes espèces confondues) et leur pourcentage sont indiqués à l'intérieur du graphique. Le nombre de candidats correspondant est indiqué en périphérie. (Il existe 10.8% de redondance pour les candidats, comme expliqué dans le texte).

## D.2. Les systèmes additionnels de filtration

Dernière étape du programme, un système de filtration appliqué à la liste finale permet de supprimer les candidats reconnus par un nombre anormalement haut de softsigns. Comme le montre la [figure 42 - B](#), certaines protéines FeS de la liste initiale, et notamment ABCE1, sont reconnues par plus de softsigns qu'elles n'en possèdent réellement. Ceci témoigne de la richesse en cystéines de certaines protéines qui ont néanmoins réussi à échapper au filtre de densité de cystéines. Nous avons donc décidé de limiter le nombre maximal de softsigns par candidats à 9 afin de conserver l'ensemble de nos protéines FeS initiales, à l'exception de Sprouty ([Figure 42 - B](#)). Ceci a permis d'exclure 576 candidats et ainsi de disposer d'une liste finale de 8879 hits ([Figure 42 - A](#)) correspondant à 13.5% de la base de données Swissprot\_Mammals.

Aucun programme Perl n'a été développé à cette étape puisque la commande Awk suivante, appliquée au fichier « results.txt », est suffisante.

```
awk -F: $NF<10
```

Le résultat de cette commande a été enregistré dans le fichier « resultsMAM9.txt », également disponible sur la clé USB jointe à la thèse. Cette liste est la liste finale et officielle de nos recherches chez les mammifères. Une version sous format excel est disponible sous le nom « Results.xlsx ».

Afin de pouvoir quantifier concrètement le nombre exact de candidats, nous avons regroupé ensemble les candidats par qualité : un candidat possédant au moins une softsign de type A est considéré de qualité A. Puis nous avons décidé d'enlever la redondance due à la présence de l'ensemble des orthologues. Ceci a permis d'obtenir concrètement le nombre de candidats total, ainsi que le nombre de candidats pour chaque niveau de qualité. On constate ainsi que les 8879 hits ne correspondent en réalité qu'à 3856 protéines différentes, donc candidats d'intérêt ([Figure 43](#) et « results.xlsx »). Ceci a également permis de constater que la plupart des hits, et donc des candidats, sont de groupe A ([Figure 43](#) - 53.2%). Cette surreprésentation s'explique par la manière de définir la qualité des protéines candidates. La commande sed qui a permis de produire les données nécessaires à la construction de ce graphique est la suivante :

```
sed 's/_.*//p' results* | sort -u | wc -l
```

## E. Etude des données

Avec la liste des protéines FeS candidates à disposition, nous avons pu rechercher dans cette liste des protéines intéressantes. Ceci s'est fait selon deux approches :

Une première approche, la plus rapide, est de parcourir la liste des protéines candidates manuellement. Particulièrement biaisée dans la mesure où l'on ne retient que les protéines dont on reconnaît le nom, cette approche a cependant permis d'isoler une liste de

Swissprot ID	Description	Candidate Group	First Softsign detected	Softsign Origin	Zinc
PRI1	DNA primase small subunit	A	C-x(5)-C-x(2)-C-x(35,37)-C	Adrenodoxin	Zinc knuckle motif
RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha	A	C-x-H-x(15,25)-C-x(2)-H	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	Zinc Finger
RXRB	Retinoic acid receptor RXR-beta	A	C-x(204,227)-C-x(2)-C-x(4,6)-C	Ferrochelatase	Zinc Finger
TF2H2	General transcription factor IIH subunit 2	A	C-x(204,227)-C-x(2)-C-x(4,6)-C	Ferrochelatase	Zinc Finger
TIF1A	Transcription intermediary factor 1-alpha	A	C-x(2)-C-x(13)-C-L	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1	Zinc Finger
DICER	Endonuclease Dicer	A	C-x(2)-C-x(2)-C-x(55,64)-C	Succinate dehydrogenase	#
NARF	Nuclear prelamina A recognition factor	A	C-x(2)-C-x(2)-C-x(55,64)-C	Succinate dehydrogenase	#
TIF1B	Transcription intermediary factor 1-beta	A	C-x(2)-C-x(2)-C-x(55,64)-C	Succinate dehydrogenase	Zinc Finger
HDAC6	Histone deacetylase 6	A	C-x(39,48)-[AFWY]-x-C-x(5)-C	Succinate dehydrogenase	Zinc Finger
POLK	DNA polymerase kappa	B	C-x(4,5)-C-x(2)-C-x(29,37)-C	Adrenodoxin-like protein	Zinc Finger
MOCS3	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3	B	C-x(143,151)-C-x(2)-G-x(45,75)-C-x(2)-C	Amidophosphoribosyltransferase (Atase or GPAT)	Zinc Finger
DPOE2	DNA polymerase epsilon subunit 2	B	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x-[EFQY]	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit	#
TAF1B	TATA box associated factor RNA polymerase I subunit B	B	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x-[EFQY]	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit	Zinc Finger
CASP2	Caspase-2	C	C-x(45,74)-P-C-x(143,283)-C-x(3)-C	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NARFL	#
VDR	Vitamin D3 receptor	C	C-x(8)-G-x(6,9)-C-x(1,2)-C-x(0,19)-C	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2	Zinc Finger
TAF3	Transcription initiation factor TFIID subunit 3	C	C-x(2)-C-x(11)-C-x(1,2)-C	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	Zinc Finger
HDAC2	Histone deacetylase 2	C	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x(4)-[KLR]	Fanconi anemia group J protein	#
P53	Cellular tumor antigen p53	C	C-x(11,20)-C-x(2,29)-C-x(31,42)-C-[EP]-x(4)-[KLR]	Fanconi anemia group J protein	Bind Zinc
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	C	C-x(3,11)-C-x-[FY]-C	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 1	Zinc Finger
RARA	Retinoic acid receptor alpha	C	C-x(3,11)-C-x-[FY]-C	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 1	Zinc Finger
RARG	Retinoic acid receptor gamma	C	C-x(3,11)-C-x-[FY]-C	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 1	Zinc Finger
RXRG	Retinoic acid receptor RXR-gamma	C	C-x(3,11)-C-x-[FY]-C	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 1	Zinc Finger

**Tableau 7 : Liste de candidats d'intérêt extraite manuellement**

Ces candidats ont été détectés de manière homogène dans l'ensemble des mammifères. La présence ou non de motifs de coordination du zinc est indiquée dans la dernière colonne.

Protein Swissprot ID	10:1 Median Ratio *	Hum. Candidate Group	Numbers of Orthologs
1 NARF	0.91	A	3
2 CLIC3	1.07	E	2
3 CLIC4	1.45	A	5
4 APC7	1.63	A	2
5 VAV3	1.75	A	2
6 CASP2	1.85	C	3
7 <b>RS3</b>	<b>2.2</b>	<b>D</b>	<b>7</b>
8 KEAP1	2.33	E	5
9 CDD	2.38	A	2
10 MOCS3	2.56	B	4
11 NU214	2.58	B	2
12 ARHG2	2.63	B	5
13 <b>NUBP2</b>	<b>2.67</b>	<b>C</b>	<b>4</b>
14 CATZ	3.13	B	4
15 DDX59	3.14	C	3
16 MED25	3.25	A	3
17 FHL2	3.4	A	4
18 PLGF	3.47	A	4
19 UBR2	3.69	A	2
20 IP3KC	3.82	C	2
21 FAS	3.88	B	4
22 MCM3	3.97	A	4
23 IAH1	4.03	C	1
24 SERA	4.28	A	7
25 IPO4	4.34	A	2
26 COT2	4.39	A	4
27 UBP10	4.53	E	1
28 ZYX	4.71	A	2
29 SQSTM	4.8	B	4
30 PGK1	4.81	D	1
31 DPS1	4.82	E	1
32 ZCHV	4.84	B	2
33 <b>GLRX3</b>	<b>4.9</b>	<b>A</b>	<b>4</b>
34 MI4GD	4.93	A	4
35 RN214	5.01	C	1
36 TBCD	5.11	A	3
37 TRI25	5.11	A	2
38 I2BP1	5.12	B	2
39 MSRB2	5.14	C	2
40 EDC4	5.26	A	3
41 S10A3	5.5	B	3
42 IF4A1	5.62	A	1
43 TGM2	5.69	E	1
44 ACLY	5.76	A	5
45 <b>FANCI</b>	<b>5.77</b>	<b>B</b>	<b>2</b>
46 COMT	5.9	A	6
47 DCTN4	5.9	A	4
48 <b>GLRX5</b>	<b>5.9</b>	<b>A</b>	<b>2</b>
49 DNMT1	5.92	A	4
50 DUS12	5.93	A	3
51 GBF1	6	B	2
52 EIF3C	6.03	A	5
53 TENS3	6.06	A	2
54 <b>ABCE1</b>	<b>6.11</b>	<b>A</b>	<b>2</b>
55 IBP4	6.35	A	6
56 CSRP1	6.37	A	5
57 ZN217	6.46	D	1
58 PUR4	6.49	E	2
59 LPP	6.67	A	3
60 HDAC6	6.92	A	2
61 PEPD	7.05	A	2
62 ZEB1	7.05	E	4
63 GRSF1	7.16	A	2
64 PHF5A	7.23	A	3
65 ZN185	7.48	A	2
66 <b>NFU1</b>	<b>7.56</b>	<b>E</b>	<b>2</b>
67 XPO5	7.63	B	2
68 PAXI	7.66	A	4
69 PML	7.74	A	2
70 P53	7.93	C	2
71 PI4KB	none	A	10
72 CLIC1	none	A	6
73 TPCP	none	A	6
74 <b>ACON</b>	<b>none</b>	<b>A</b>	<b>5</b>
75 DUS1L	none	A	3
76 EMR1	none	A	3
77 FBLN1	none	A	3
78 NNMT	none	A	3
79 CAS5	none	A	2
80 FGD5	none	A	2
81 IBP7	none	A	2
82 MED13	none	A	2
83 PKHF2	none	A	2
84 SPSB3	none	A	2
85 TOPB1	none	A	2
86 LIMS3	none	A	1
87 NALP4	none	A	1
88 UN93B	none	A	1
89 TBAL3	none	C	1
90 ZN611	none	C	1
91 SPT6H	none	E	2

**Tableau 8 : Filtration des candidats par une approche perpendiculaire : la réactivité des cystéines**

(\* Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteins. E. Weerapana & al. (2010) Nature, Supplementary table 1 & Supplementary Excel files).

vingt-deux candidats (Tableau 6). Parmi eux, on retrouve un certain nombre de récepteurs nucléaires, de facteurs de transcription, de sous-unités de polymérases ou encore d'histones désacétylases. On retrouve également MOCS3, dont nous parlerons dans le chapitre prochain, ou encore l'endoribonucléase DICER et le facteur de transcription p53. Tous ces candidats ont été détectés de manière homogène sur les orthologues mammifères, c'est-à-dire que la majeure partie des homologues partage la même softsign présentée dans le tableau 6 d'une espèce à l'autre. Toutes ces protéines ont également été détectées par d'autres softsigns (results.xlsx). De manière intéressante, on constate que la majeure partie de ces protéines sont décrites comme possédant des doigts de zinc (Tableau 7). Loin de faire d'eux de « faux-positifs », dans la mesure où des récentes études tendent à prouver que certains d'entre-eux sont en fait des motifs de coordination des cluster FeS (Netz et al., 2012), il me semble tout à fait digne d'intérêt de s'attarder sur eux. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant.

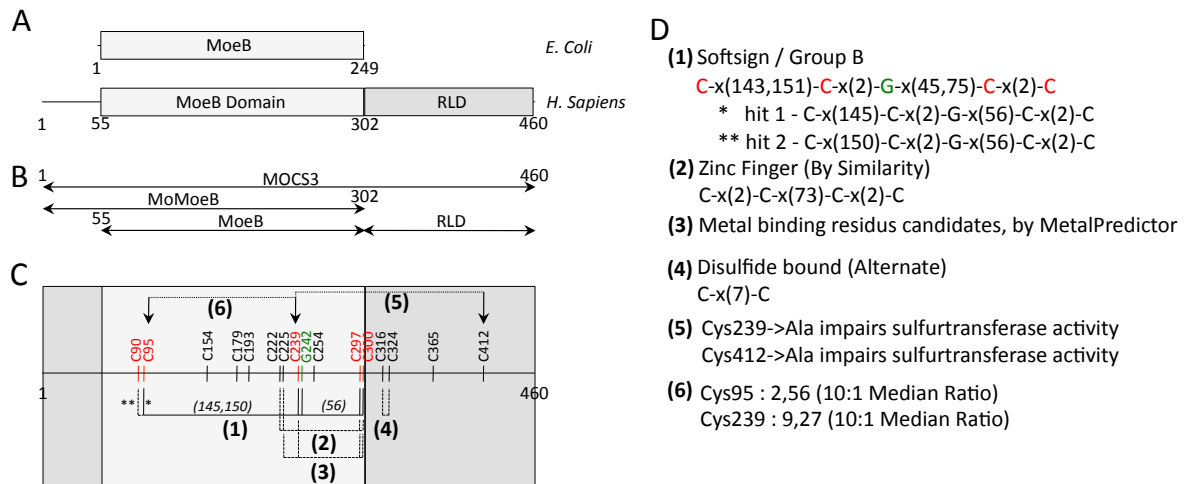
Une seconde approche se base sur une étude réalisée sur la réactivité des cystéines (Weerapana et al., 2010b) dont nous avons précédemment parlé. Quelles que soient les limites qu'apporte une telle technique vis-à-vis de l'identification de protéine FeS, elle permet tout du moins de montrer à quel point deux approches perpendiculaires peuvent significativement réduire la quantité de candidats et ainsi concentrer notre attention sur un pool nettement plus réduit. Le tableau 8 présente le recoupement entre les résultats présentés dans la publication de Weerapana et nos propres résultats. Sont annotés le nom des protéines, le ratio médian qui représente la réactivité des cystéines (Weerapana et al., 2010b), le groupe (A à E) des candidats et l'homogénéité de leurs détections auprès de leurs orthologues (tableau 8). Cette approche a permis de retrouver 8 protéines FeS de notre liste initiale (tableau 8 en gras) mais également d'autres protéines d'intérêt comme MOCS3.

## **II.4. MOCS3 : un candidat d'intérêt**

### **II.4.1. Introduction**

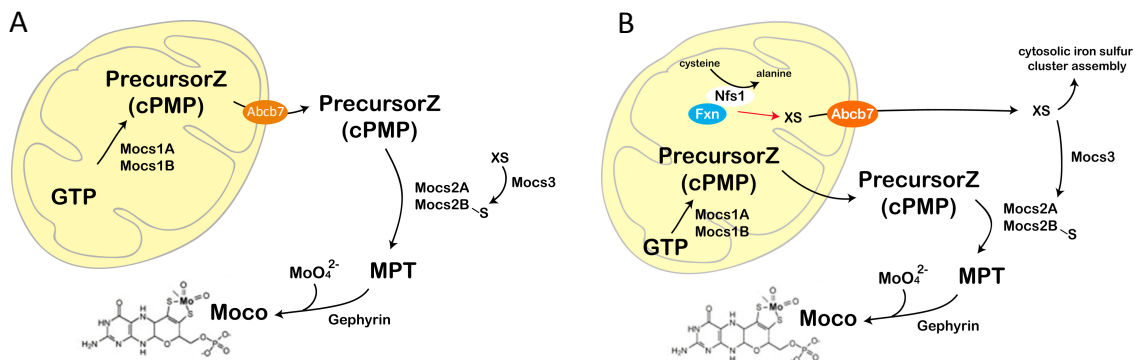
Dès les premiers essais du programme PredISC, un candidat intéressant est apparu au milieu des autres : MOCS3. Cette protéine cytosolique est impliquée dans la biosynthèse du cofacteur molybdène (Schwarz et al., 2009). A l'origine, cette protéine était annotée comme contenant l'un des deux motifs de coordination des clusters FeS de MOCS1. Avec les améliorations apportées aux signatures et aux filtres, MOCS3 est désormais un candidat du groupe B avec un motif typique de la GPAT (annotée PUR1\_HUMAN dans la tableau 5). Bien qu'il n'existe aucune conservation entre le domaine de coordination du cluster de la GPAT et le domaine candidat de MOCS3 en dehors du motif "C-x(143,151)-C-x(2)-G-x(45,75)-C-x(2)-C" qui se trouve dans le domaine MoeB (Figure 44), l'étude de la protéine a été initiée et doit être poursuivie pour différentes raisons que nous allons décrire ci-après.

Le cofacteur molybdène (MOCO) est essentiel pour le fonctionnement d'un certain nombre d'enzymes chez les eucaryotes parmi lesquelles on retrouve notamment la sulfite



**Figure 44 : Caractéristiques de MOCS3 humain**

**A** : Alignement schématique entre MOCS3 humain et son orthologue chez *E. Coli*, MoeB. **B** : Description schématique des différentes constructions clonées en pCDF. **C** : Représentation à l'échelle des cystéines de MOCS3 et annotations des hypothèses proposées pour leur fonction. **D** : Description précise des annotations. **(1)** : Softsigns prédites par le programme PredISC. **(2)** Doigts de zinc extrait par similarité (Swissprot). **(3)** : Résidus proposés comme coordonnant des métaux par Metalpredictor. **(4)** : Pont disulfure (Swissprot). **(5)** : Cystéines essentielles, selon E. Weerapana & al. (2010), Nature vol.468, 790-797. **(6)** : Cystéines réactives, selon A. Mathies & al. (2004), PNAS vol.101, 5946-5951.



**Figure 45 : Hypothèses de travail concernant la synthèse du cofacteur MOCO**

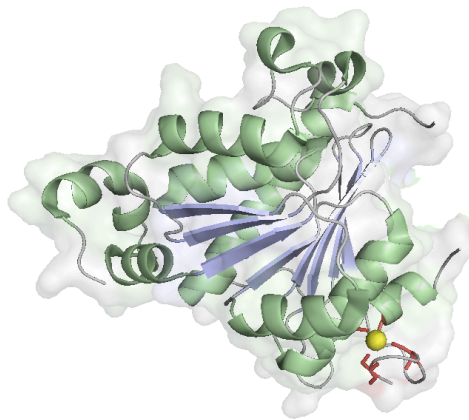
**(A)** Hypothèse suggérant un transport du cPMP par Abcb7 et une origine de l'espèce soufrée substrat de MOCS3 exclusivement cytosolique, par exemple par une version cytosolique de la désulfurase NFS1. **(B)** Hypothèse du laboratoire suggérant un transport de l'espèce soufrée substrat de MOCS3 depuis la mitochondrie, par Abcb7. Dans cette hypothèse, l'activité de MOCS3 dépend directement du bon fonctionnement de la machinerie mitochondriale de biosynthèse des clusters FeS. (Il est à noter que si MOCS3 est lui même une protéine FeS, il dépendra à double raisons de la machinerie ISC). (Adaptée à partir d'une figure d'Alain Martelli).

oxydase, la xanthine deshydrogénase et l'aldéhyde oxydase (Mendel and Bittner, 2006), les deux derniers exemples étant également des protéines FeS. La biosynthèse de ce cofacteur nécessite différents partenaires : la protéine mitochondriale MOCS1 qui est également une protéine FeS, et les protéines cytosoliques MOCS2A, MOCS2B, MOCS3 et Gephyrine (Schwarz et al., 2009). L'absence du cofacteur MOCO, observé chez des patients atteints de différentes anomalies génétiques affectant la machinerie de biosynthèse, conduit généralement à une accumulation progressive de dommages neurologiques entraînant la mort dès le jeune âge (Schwarz et al., 2009).

Des études ont été réalisées afin d'identifier le ou les rôles de MOCS3 ainsi que pour caractériser les deux domaines qui le composent à savoir le MoeB-like domain en N-terminal et le Rhodanese-like domain (ou RLD) en C-terminal (Figure 44 - A). Ainsi, différentes études ont proposé que la cystéine désulfurase NFS1, tout du moins sa fraction cytosolique, serait la source du soufre dont MOCS3 a besoin lors de son interaction avec MOCS2A (Figure 45) (Marelja et al., 2008, 2013). Ceci fait d'ailleurs le parallèle avec le modèle bactérien où IscS a été proposé comme interacteur et origine du soufre nécessaire à MoeB (Zhang et al., 2010). Il est cependant important de noter que l'existence d'une fraction cytosolique de NFS1 est controversée. Par ailleurs, le RLD de MOCS3 a été caractérisé comme ayant une activité sulfurtransférase et la cystéine 412 a été décrite comme essentielle pour cette activité (Figure 44) (Krepinsky and Leimkühler, 2007; Matthies et al., 2004, 2005). Cependant, aucune étude poussée du MoeB-domain de MOCS3 mammifère n'a été faite. Néanmoins, les études réalisées dans les modèles bactériens et levures où l'équivalent de MOCS3 ne possède que la partie N-terminale, à savoir le MoeB-like domain, permettent de suggérer premièrement la présence dans ce dernier d'un motif de coordination du zinc (Figure 44), deuxièmement d'attester de son rôle dans la fixation de MOCS2A par la formation d'une liaison réversible acyl-adenylate, et troisièmement de faire l'hypothèse d'un rôle du thiol de la cystéine 239 pour le relargage du groupement thio-carbocylate formé sur le RLD (Figure 44) (Lake et al., 2001; Schmitz et al., 2008). Parallèlement, des études sur la fonction d'ABCB7, un transporteur nécessaire à la maturation de protéines FeS extramitochondriales (Bekri et al., 2000; Cavadini et al., 2007; Lill and Mühlhoff, 2005), ont été faites au sein de cette voie de biosynthèse du MOCO. En effet, l'hypothèse du rôle de son orthologue chez *A. Thaliana*, atm3, comme transporteur du cPMP (ou précurseur Z) de la mitochondrie vers le cytosol a été émise (Teschner et al., 2010) (Figure 45).

#### II.4.2. MOCS3, un candidat d'intérêt

La première raison qui a suscité l'intérêt pour MOCS3 est d'ordre expérimental. En effet, des études réalisées dans le laboratoire sur des modèles souris avec des délétions dans le foie de la frataxine ou d'ABCB7 ont permis de constater une diminution de la concentration en cofacteur MOCO. Dans la mesure où la frataxine est nécessaire à la maturation des protéines FeS, il n'apparaît pas surprenant de faire ce constat puisque MOCS1 en est une.



**Figure 46 : Structure schématique de MoeB chez *E. Coli* (PDB : 1JW9)**

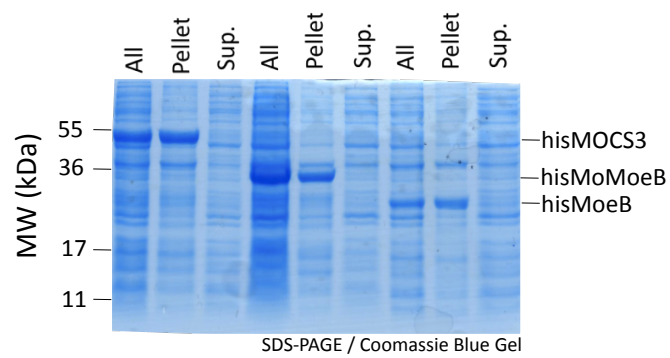
En rouge, les cystéines impliquées dans la coordination du zinc. En jaune, le zinc ; en bleu, les feuillets ; en vert, les hélices.

D'autre part, l'observation similaire faite avec la délétion d'ABCB7 semble confirmer l'hypothèse d'un rôle direct de cette protéine dans la voie de biosynthèse du MOCO. Cependant, l'analyse de la concentration de l'intermédiaire cPMP a révélé qu'une délétion en frataxine affecte la biosynthèse non seulement à l'étape mitochondriale (faible niveau résiduel de cPMP) mais également à l'étape extramitochondriale (accumulation de cPMP). Si l'observation mitochondriale peut être expliquée par une activité réduite de MOCS1, le blocage de la biosynthèse en dehors de la mitochondrie est inexplicable. D'autre part, dans le cas de la délétion d'ABCB7, seule l'étape cytosolique est affectée (accumulation de cPMP), suggérant par ailleurs que le cPMP n'est pas transportée par cette protéine (Figure 45 - B). Ainsi, il semble qu'au moins un des partenaires de la biosynthèse du MOCO impliqué dans l'utilisation du cPMP, nommément MOCS2A, MOCS2B ou indirectement MOCS3, a besoin de la frataxine et d'ABCB7. Dans la mesure où le point commun entre ces deux dernières protéines est la maturation des protéines FeS extramitochondriales, MOCS3 est rapidement devenu un candidat d'intérêt soit en tant que receveur d'une espèce soufrée passant par ABCB7 (Figure 45 - B), soit comme protéine FeS à part entière (Alain Martelli - données non publiées).

La seconde raison qui suggère que MOCS3 est un candidat de choix est l'existence dans sa séquence d'un motif de type doigt de zinc "C-x(2)-C-x(73)-C-x(2)-C" (Figure 44 - C & D), motif conservé au cours de l'évolution et qui correspond en partie au motif détecté par le programme PredISC. En effet, la forme bactérienne de MOCS3, MoeB, a été cristallisée avec du zinc (Figure 46) (Lake et al., 2001). Or, comme l'ont montré différentes études, un certain nombre de motifs considérés comme coordonnant du zinc, même expérimentalement, sont en réalité des motifs de coordination de clusters FeS. C'est le cas notamment pour Iscu, la protéine d'échafaudage sur laquelle sont fabriqués les clusters FeS (Ramelot et al., 2004), mais également pour MitoNEET (CISD1) (Lin et al., 2007) ou Miner1 (CISD2) (Conlan et al., 2009). Plus récemment, le même constat a été fait avec plusieurs polymérases (Netz et al., 2012). La sensibilité à l'oxygène et l'extrême labilité des clusters FeS conjuguées à des protocoles de purifications en présence de zinc et en aérobie a vraisemblablement biaisé nombre d'études. Enfin, dans l'hypothèse d'un vrai doigt de zinc dans MoeB, il est important de noter quelques différences importantes. Une partie du domaine doigt de zinc de MOCS3 est peu conservé, notamment la cystéine 239 qui n'a pas d'équivalent fonctionnel chez MoeB (Matthies et al., 2004). Pourtant, la mutation de la cystéine 239 réduit drastiquement l'activité sulfurtransférase de MOCS3, suggérant un rôle essentiel de cette dernière (Matthies et al., 2004). D'autre part, la présence d'un domaine additionnel, le Rhodanese-like Domain (RLD) qui débute à proximité du doigt de zinc peut également avoir une influence sur ce dernier. L'hypothèse de la présence d'un cluster FeS à la place du zinc est donc à tester.

Troisièmement, une analyse bioinformatique complémentaire à la notre suggère, si ce n'est la présence d'un cluster FeS, en tous cas celle de métal. Au delà du motif de coordination de clusters FeS que nous avons détecté deux fois dans MOCS3, le logiciel MetalPredictorV2.0 (Passerini et al., 2011) prédit la présence de métal coordonné par les cystéines 225-239-297-300 formant ainsi le motif "C-x(15)-C-x(59)-C-x(2)-C" et suggérant un hybride entre notre





**Figure 47 : Expression et solubilité de hMOCS3, hMoeB et hMoMoeB**

Les fractions solubles (Sup.) et insolubles (Pellet) ont été séparées par centrifugation après sonication des bactéries. *MW* : *molecular weight*.

motif et le doigt de zinc (Figure 44). Une autre étude se penchant plus particulièrement sur la réactivité des cystéines (Weerapana et al., 2010b), a identifié les cystéines 95 et 239 de MOCS3, toutes deux présentes dans le motif issu de notre programme PredISC (Tableau 8). Même s'il est nécessaire d'apporter des limites à cette approche dans la mesure où les cystéines coordonnant les clusters ne sont pas systématiquement "hyper-réactives", cette observation est pour le moins intéressante puisque, comme la précédente, elle met en valeur la cystéine 239 typique de MOCS3.

Enfin, et il s'agit plus d'une conjecture personnelle, une dernière raison justifie l'intérêt de son étude. Le mécanisme exact qui permet à la cystéine 420 du RLD de récupérer du soufre et de former ainsi un persulfure capable de fixer un carboxylate de MOCS2A est inconnu. Si l'hypothèse d'un transfert direct par la fraction cytosolique de NFS1 par transpersulfuration est possible quoique contestable, un transfert depuis la mitochondrie par l'intermédiaire d'un précurseur soufré est une hypothèse vraisemblable (Figure 45). Or, une étude très récente portant sur deux protéines FeS de type méthylthio-transférase, RimO et MiaB (Forouhar et al., 2013) a permis d'établir qu'un cluster FeS est capable d'activer un co-substrat soufré en restant intact, jouant ainsi un rôle de « transfert ». Même si les mécanismes sont probablement différents dans la mesure où les fonctions ne sont pas les mêmes, il n'est cependant pas impossible d'imaginer qu'un cluster FeS présent dans le MoeB-like domain pourrait participer à l'activation d'un intermédiaire soufré et à son transfert sur la cystéine 420. A ce titre, il est intéressant de noter l'implication de MOCS3 dans la thiolation d'ARNt (Chowdhury et al., 2012).

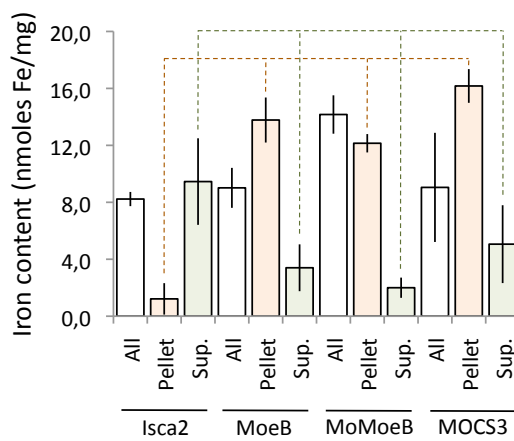
### II.4.3. MOCS3, expériences préliminaires

#### A. Clonage et tests de purification

Forts de nos différentes observations, nous avons entrepris le clonage, l'expression et la purification de MOCS3 et de son domaine MoeB (Figure 44 - B). Un protocole de purification de MOCS3 humain dans la bactérie avait d'ores et déjà été décrit, aussi nous avons tenté de le reproduire (Matthies et al., 2004).

- His-MOCS3, His-MoMoeB et His-MoeB (Figure 44 - B) ont été clonés dans des vecteurs pCDF (HisMoeBNt : 5'-ATTATTCATATGCATCACCATCATCACCACGCCGCTCTGTCCCG-3'; MoeBCt : 5'-ATTATTAGATCTTCATTCCCCGCAAGCTGC-3' ; HisMOCS3F : 5'-ATTATTCATATGCATCACCATCATCACCACGCTTCCCGGGAGGAGG-3' ; MOCS3RLD-R : 5'-ATACCAGGATCCTCAGTACTGTGGAAA TG-3'). Les vecteurs ainsi obtenus ont été transformés dans des bactéries BL21 DE3 pRARE2, BL21 DE3 pLys GroES/EL et des Artic DE3 cpn10/60. L'idée sous-jacente était d'avoir la meilleure expression pour le premier type de bactérie, ou les meilleures solubilités pour les deux derniers.

- Différentes expressions ont été réalisées, selon le type de bactéries utilisées. Les BL21 DE3 pRARE2 ont été cultivées à 22°C en suivant le protocole décrit (Figure 47) (Matthies et al., 2004). Hélas, si les expressions ont été importantes pour MOCS3, MoeB



**Figure 48 : Quantification du Fer dans les fractions solubles et insolubles de MOCS3, MoeB et MoMoeB**  
 La protéine Isca2 est utilisée comme référence. (L'ensemble des valeurs est normalisé sur des cultures non-induites). Sup. : supernatant.

et MoMoeB, la solubilité était nulle. Les expériences réalisées avec BL21 DE3 pLys GroES/EL à 17°C et avec les Artic DE3 cpn10/60 à 7°C n'ont en rien amélioré les résultats. Des inductions à l'IPTG à haute D.O. ont été faites afin de limiter le niveau de production ainsi que des lyses par le froid et en anaérobie afin de protéger d'éventuels clusters FeS, sans plus de succès (Données préliminaires).

Les expériences précédentes réalisées sur MOCS3 (Matthies et al., 2004) nécessitaient le clonage avec un tag GST et son clivage. Ceci peut expliquer en partie la mauvaise solubilité que nous avons obtenue dans la mesure où nous avons choisi des tags HIS. Il est cependant important de remarquer que la qualité de la purification était plutôt faible (Matthies et al., 2004). De plus, un protocole plus récent implique l'utilisation de cellules d'insectes, suggérant que la purification de MOCS3 pose généralement des problèmes (Chowdhury et al., 2012; Marelja et al., 2013). Dans la mesure où le domaine MoeB de MOCS3 possède potentiellement un doigt de zinc, il aurait peut être été nécessaire de réaliser des purifications en présence de zinc. Enfin, si l'hypothèse de la présence d'un cluster FeS est bonne, une production en anaérobie aurait pu être envisagée afin de le préserver au mieux, et ainsi éventuellement contribuer à la stabilité de la protéine.

## B. Quantification du fer

En l'absence d'un protocole de purification efficace, nous avons décidé de mesurer directement le contenu en fer dans les culots et les surnageants en prenant pour contrôle la protéine ISCA2 qui a été préalablement identifiée comme une protéine FeS (Alain Martelli, données non publiées). L'idée sous-jacente est de vérifier si premièrement il y a une accumulation de fer, et deuxièmement si celle-ci est observée dans la fraction où la protéine se trouve.

- Les bactéries BL21 DE3 pRARE2 contenant ISCA2-His, HisMOCS3, HisMoMoeB ou HisMoeB ont été mises en cultures à 22°C et soniquées. Des cultures identiques mais non-induites à l'IPTG ont été utilisées pour normaliser les valeurs, et l'expérience répétée trois fois indépendamment.
- Si la variabilité au sein des expériences reste importante, il apparaît que l'accumulation de fer au sein des culots de HisMOCS3, HisMoMoeB et HisMoeB est significativement supérieure à celle dans ISCA2 (Figure 48). A l'inverse, l'accumulation de fer au sein des surnageant de HisMOCS3, HisMoMoeB et HisMoeB est significativement inférieure à celui dans ISCA2.

Il apparaît donc que l'induction des cultures de HisMOCS3, HisMoMoeB et HisMoeB entraîne une accumulation de fer spécifiquement dans les culots, c'est-à-dire dans la fraction contenant les protéines induites. La production d'ISCA2 entraîne également l'accumulation de fer mais dans le surnageant, ISCA2 étant majoritairement soluble.



A défaut de prouver que MOCS3, et plus particulièrement son domaine MoeB, contient un cluster FeS, ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre l'accumulation de fer dans les fractions insolubles et la surexpression de la protéine insoluble MOCS3, ou de son domaine MoeB, ce qui est très encourageant. La spectroscopie Mossbauer réalisée directement sur des culots induits ou non-induits de MOCS3 pourrait être utilisée comme démonstration indirecte de la présence possible d'un cluster FeS dans MOCS3.

## **II.5. Conclusions et objectifs**

En se basant sur les motifs de coordination des clusters FeS, nous avons été capables de réaliser le programme PredISC. Ce programme nous a permis de prédire la présence éventuelle de clusters FeS dans une liste relativement réduite de protéines mammifères. Différentes améliorations ont été apportées au système de recherche de motifs grâce à des filtres dont les actions touchent aussi bien la densité de cystéines, les différentes formes de répétitions de motifs ainsi que l'optimisation des softsigns. Parfaitement souple dans son utilisation, ce programme peut être utilisé pour la recherche de protéines FeS dans n'importe quelle base de donnée, et partant d'une liste initiale complètement différente au besoin. Bien qu'allant au delà du cas présent, le programme PredISC pourrait en réalité être utilisé pour prédire n'importe quel motif et son action peut s'étendre au delà du monde des FeS.

Si la liste finale est parfaitement accessible sous sa forme Excel (results.xlsx), la création d'une base de données permettrait de combiner au mieux l'ensemble des informations de manière nettement plus ergonomique. Une des premières améliorations serait notamment le regroupement des orthologues afin d'augmenter la lisibilité. Ensuite, la possibilité de pouvoir disposer des indications précises, et ceci de manière visuelle, des localisations des softsigns reconnues dans les séquences. La possibilité de disposer d'une base de données permettrait également de pouvoir aisément faire le lien entre les protéines, leurs softsigns, les alignements et les arbres réalisées sur leurs domaines. Enfin, une base de données pourrait regrouper en parallèle nombre d'informations d'ores et déjà disponibles concernant non seulement la présence d'autres motifs dans les séquences, les fonctions, la localisation cellulaire ou la spécificité tissulaire des protéines, ou encore leur(s) rôle(s) dans des voies de signalisation et/ou de biosynthèse.

Par ailleurs, si la création d'une base de données donnerait une réelle plus-value à ces résultats en les rendant plus lisibles et aisément consultables, l'utilisation d'approches perpendiculaires et de préférences expérimentales pourrait considérablement réduire la quantité de données. A titre personnel, et dans la mesure où l'effet primaire de l'absence de frataxine est un déficit fonctionnel des protéines à noyaux FeS, je reste convaincu qu'une fraction significative des protéines FeS doit nécessairement être déstabilisée quantitativement parlant. Aussi, en attendant que les techniques d'Iron-ôme soient optimisées, il me semblerait particulièrement passionnant de réaliser des expériences de



MudPIT sur des tissus de souris délétés en frataxine à des étapes les plus pré-symptomatiques possibles.

Par ailleurs, nous avons essayé de valider notre approche en étudiant MOCS3, pour l'instant sans succès. Cependant, de nombreux indices laissent supposer que nous sommes sur la bonne voie. La possibilité de réaliser de la spectrométrie Mossbauer ou de la RPE sur des culots de MOCS3 pourrait dans un premier temps véritablement relancer ce projet. Dans la mesure où la protéine semble être nettement plus purifiable lorsqu'elle est exprimée dans des cellules d'insectes, et puisque ce type de technologie et les personnes compétentes sont présentes ici-même, à l'IGBMC, je reste également convaincu que nous avons là la possibilité d'aider à la concrétisation d'un projet tout à fait inédit par l'utilisation d'approches particulièrement transversales. Parallèlement à cela, il serait également important de tenter de valider l'approche en étudiant un nombre nettement plus significatif de candidats y compris, et peut-être même particulièrement, certaines protéines définies comme doigt de zinc. En effet, ceci permettrait de contribuer à ce qui pourrait être, si cela se confirme, une véritable révolution conceptuelle de l'importance pourtant déjà grandissante des clusters FeS dans le monde du vivant (Huber and Wächtershäuser, 1998).





## Discussion

---

### I - Préambule

Grâce à de très précieux travaux réalisés au sein du laboratoire, j'ai eu au cours de ma thèse le privilège de pouvoir m'affranchir progressivement de nombreuses questions faisant débat dans le domaine de l'ataxie de Friedreich, et particulièrement dans celui de l'étude de la frataxine. En effet, il est scientifiquement presque « acquis » que l'unique fonction de la frataxine réside dans son implication, sous sa forme mature et monomérique, dans la biosynthèse des clusters FeS dans la mitochondrie au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU (Schmucker et al., 2011).

Ainsi, j'ai pu concentrer mes efforts sur la machinerie de biosynthèse des clusters FeS. J'ai ainsi pu mettre en place des systèmes de purification efficaces des complexes ternaire NFS1/ISD11/ISCU (Schmucker et al., 2011) et quaternaire NFS1/ISD11/ISCU/FXN et réussi à affiner leur caractérisation notamment lors de la biosynthèse de clusters FeS *in vitro* (Colin et al., 2013). Il a donc été possible pour moi d'étudier la (ou les) fonction(s) essentielle(s) de la frataxine, notamment son implication dans la régulation de la production de sulfure et l'incorporation du fer, ainsi que ses effets sur la formation des clusters FeS et leur transfert. Ceci me permet aujourd'hui d'avoir plusieurs hypothèses précisant le rôle de la frataxine dans la biosynthèse des clusters FeS, et de pouvoir proposer un certain nombre d'expériences qui permettraient de les vérifier.

Parallèlement à cela, et dans une optique plus globale de compréhension de l'ataxie de Friedreich, j'ai eu la chance de pouvoir réaliser des recherches en bioinformatique afin d'identifier de potentielles protéines FeS chez les mammifères (partie Bioinformatique, résultats). Si cet aspect n'a pas été aussi abouti que le précédent, il a cependant permis de jeter les bases d'études futures que j'imagine transversales en couplant ces approches informatiques avec de la biologie moléculaire et de la biochimie. Ces recherches et les nombreuses publications dans ce domaine scientifique, nous permettent également de montrer à quel point le monde des protéines FeS et celui des protéines à doigts de zinc semblent se rapprocher. Ceci présage une évolution positive et significative de l'intérêt de la communauté scientifique pour les clusters FeS.

### II - Les interactions de la frataxine

#### II.1. Interactions non-essentiels et oligomérisation de la frataxine

Préalable à la compréhension même du rôle de la frataxine, la caractérisation de ses interacteurs a été réalisée très extensivement au sein de notre laboratoire (Schmucker et al., 2011). J'ai ainsi pu partir du constat que la frataxine n'interagit qu'avec le complexe précoce de biosynthèse des clusters FeS NFS1/ISD11/ISCU sous sa forme mature, et avec la protéine de maturation MPP $\beta$  sous sa forme précurseur ou intermédiaire. Ces observations ont été



clairement caractérisées par GST-pulldown à partir d'extraits de cellules mammifères et après incubation des différents partenaires purifiés, au sein de notre laboratoire. Des études complémentaires par spectrométrie de masse ont également permis de confirmer ces observations. Aujourd'hui, l'hypothèse d'un rôle essentiel de la frataxine dans le mécanisme de biosynthèse des clusters FeS fait consensus, et ceci pour l'ensemble des organismes modèles. Parallèlement à cela, et comme nous l'avons fait remarquer dans notre introduction, les différentes observations qui mettent en évidence l'existence d'oligomères de frataxine, notamment dans le modèle levure en présence d'excès de fer ou de la mutation Y73A, n'ont jamais été démontrées comme essentielles *in vivo*. De plus, la forme mature et majoritaire de la frataxine mammifère est incapable d'oligomériser, y compris en présence d'excès de fer. Ceci réduit significativement l'intérêt fonctionnel de ce mécanisme, et suggère qu'il n'a pas de rôle physiologique.

## II.2. Interaction avec les partenaires de la biosynthèse des clusters FeS

La manière avec laquelle la frataxine interagit avec les partenaires de la biosynthèse des clusters FeS reste encore mal caractérisée. En effet, nous avons pu constater que la frataxine mammifère interagissait exclusivement avec le complexe NFS1/ISD11/ISCU, mais pas avec chacune de ces protéines isolées ni avec le sous-complexe NFS1/ISD11 (Schmucker et al., 2011). Ceci suggère une interaction multiple et donc une zone d'interaction de la frataxine située sur plusieurs partenaires.

Rappelons que les interactions CyaY/IscS, CyaY/IscU, Yfh1/Nfs1/Isd11 ou encore Yfh1/Isu (en présence de fer dans ce dernier cas) ont été observées. Cependant, les conditions peu stringentes nécessaires pour faire ces observations suggèrent que ces interactions sont faibles. Comme il est très peu probable que le mécanisme physiologique d'interaction de la frataxine avec les protéines du complexe précoce de biosynthèse soit réellement différent d'une espèce à l'autre, je fais l'hypothèse qu'il s'agit ici plutôt de variations dues à des différences physico-chimiques des zones d'interactions.

La mise en commun de l'ensemble des informations disponibles par RMN et mutagenèse dirigée sur la frataxine pour les différents modèles bactérien, levure et mammifère, nous permet de faire les observations suivantes. (1) La région chargée négativement de la frataxine, et plus précisément l'extrémité de la première hélice  $\alpha$  et le début du premier brin du feuillet  $\beta$ , permet son interaction avec la cystéine désulfurase NFS1 (IscS). (2) La région contenant le W155 (nomenclature humaine) au sein du feuillet  $\beta$  est plutôt impliquée dans l'interaction avec la protéine d'échafaudage ISCU (IscU).

Fort de ces observations, qui sont à ce jour surtout très convaincantes dans le modèle bactérien, on peut se poser la question suivante : quelle est la zone d'interaction de la frataxine sur NFS1 et ISCU ? Sur la désulfurase, la zone d'interaction avec la frataxine semble se concentrer sur une région chargée positivement contenant notamment les résidus R220 et R223 (nomenclature bactérienne) (Shi et al., 2010). Ces informations restent cependant



encore très parcellaires et nécessiteraient de nombreuses investigations supplémentaires. Par contre, il n'existe aucune information expérimentale disponible quant à la zone d'interaction entre la frataxine et la protéine d'échafaudage ISCU. Nous y reviendrons cependant dans le chapitre suivant, lors de la présentation de nos hypothèses de travail. L'hypothèse d'une interaction directe entre la frataxine et ISD11 au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN que nous avons évoqué dans l'introduction doit être considérée comme potentielle mais elle a une limite importante. En effet, si en l'absence d'ISD11 la frataxine ne peut se fixer sur le complexe NFS1/ISCU, la formation même du complexe NFS1/ISCU est très nettement perturbée (Schmucker et al., 2011). Par ailleurs, les publications récentes attestent de plus en plus de l'importance fonctionnelle d'ISD11 vis-à-vis de l'activité de NFS1, comme en attestent les mutations fonctionnelles du motif LYR d'ISD11 (Lim et al., 2013), et les modèles proposés suggèrent une localisation d'ISD11 sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN (Amela et al., 2013) à distance de la frataxine et d'ISCU. ISD11 apparaît donc de plus en plus comme un modulateur de l'activité de NFS1, et non comme un partenaire pour l'interaction de la cystéine désulfurase avec la frataxine. L'obtention de données structurales sur les complexes eucaryotes devrait permettre de répondre à ce questionnement.

### **II.3. Stœchiométrie des complexes ternaire et quaternaire**

Les études précédentes réalisées dans le laboratoire ont permis de déterminer précisément par spectrométrie de masse la stœchiométrie du complexe quaternaire NFS1/ISD11/ISCU/FXN (189kDa) suggérant un ratio 2/4/2/2 (Schmucker et al., 2011). Il est cependant apparu surprenant de proposer une présence sur-stœchiométrique pour ISD11 vis-à-vis des autres partenaires. Si cette protéine est petite (<11kDa), les marges d'erreurs par spectrométrie de masse native sont faibles, et ne pourraient expliquer un décalage aussi important que 22kDa, correspondant à la masse de deux molécules d'ISD11 additionnelles. L'hypothèse d'une fixation aspécifique par un contaminant non détectable par spectrométrie de masse native ou coloration par Bleu de Coomassie serait la seule possibilité, même si elle semble peu probable.

Mes différents essais de purification à grande échelle du complexe NFS1/ISD11 ayant échoué pour des raisons de stabilité, j'ai concentré mes efforts sur le complexe ternaire NFS1/ISD11/ISCU. Ce complexe, nettement moins stable que le complexe quaternaire a finalement pu être analysé par spectrométrie de masse native et nous a permis de confirmer la stœchiométrie d'ISD11 (Colin et al., 2013). Avec une masse de 161kDa, soit environ 28kDa de moins que le complexe quaternaire, il correspond à la masse d'un complexe quaternaire à laquelle est retranchée la masse de deux frataxines (NFS1<sub>2</sub>/ISD11<sub>4</sub>/ISCU<sub>2</sub>). Remarquons que mes expériences d'incubation du complexe ternaire avec de la frataxine ont suggéré une masse totale de 184kDa par spectrométrie de masse native, soit une masse peu inférieure à la masse du complexe quaternaire purifié comme tel. Ce décalage de masse, quoique surprenant,



ne remet pas en doute notre hypothèse sur la stœchiométrie des complexes, et notamment celle d'ISD11.

Sur cet aspect là aussi, les données structurales font cruellement défaut. Les investigations réalisées actuellement dans le laboratoire de Juan Fontecillas pourraient, en outre, clairement répondre à cette question. Il est à noter que les modèles bioinformatiques disponibles du complexe quaternaire suggèrent jusqu'à présent plutôt une stœchiométrie NFS1<sub>2</sub>/ISD11<sub>2</sub>/ISCU<sub>2</sub>/FXN<sub>2</sub>, avec une zone d'interaction d'ISD11 sur l'arrière du petit domaine de NFS1, seule région de la cystéine désulfurase où il existe un « patch » de résidus de surface non-conservé avec IscS (Amela et al., 2013).

### III - Le ou les rôle(s) de la frataxine

Différentes hypothèses sont aujourd'hui émises pour définir le rôle de la frataxine au cours de la biosynthèse des clusters FeS. Ces hypothèses ne sont pas exclusives, et le rôle de la frataxine pourrait au final s'avérer multiple.

#### III.1. La frataxine comme donneur de fer

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, l'hypothèse la plus communément proposée pour la frataxine est son rôle possible de donneur de fer. Aujourd'hui nous connaissons parfaitement bien les régions de fixation du fer sur les différents orthologues de la frataxine *in vitro* (Figure 27). Même si l'affinité du fer pour cette région est faible, on peut imaginer que cette fonction existe *in vivo*. Rappelons que le fer a été montré comme étant capable de stabiliser l'interaction entre les différents partenaires Yfh1, Nfs1/Isd11 et Isu chez la levure (Gerber et al., 2003). Cependant, le modèle levure est particulier en ce sens où une interaction directe Yfh1/Isu est observée uniquement en présence de fer (Cook et al., 2010). Par ailleurs les études *in vivo* dans les modèles levures ou murins délétés en frataxine montre une activité résiduelle des protéines FeS, ce qui est en évidente contradiction avec un rôle unique de donneur de fer (voir revue (Perdomini et al., 2013)).

Une autre limite importante à l'étude de cette hypothèse réside dans le recouvrement presque complet sur la frataxine de la zone de fixation du fer et d'interaction avec la cystéine désulfurase (Figure 27-28). Ceci complique très sensiblement l'analyse fonctionnelle puisqu'il est *a priori* impossible de réaliser des mutations qui n'affecteraient que l'un de ces deux aspects. Il est important de remarquer cependant qu'une partie significative de l'hélice  $\alpha 1$  chargée négativement échappe à ce recouvrement (Figure 27). Des mutations dans cette région pourraient permettre d'étudier cette hypothèse en dissociant parfaitement l'aspect fixation du fer et l'interaction FXN/NFS1.

En utilisant le système wild-type, nous avons pu confirmer que la frataxine est capable de fixer du fer lorsqu'elle est sous forme monomérique, mais également qu'elle en est incapable lorsqu'elle fait partie du complexe quaternaire NFS1/ISD11/ISCU/FXN. Nous avons





aussi pu montrer que la frataxine influence considérablement l'incorporation du fer au sein du complexe au cours de la biosynthèse des clusters FeS (Colin et al., 2013). Ces observations suggèrent que la frataxine pourrait jouer un rôle non pas de donneur de fer, mais plutôt de médiateur de son entrée. Nous reviendrons sur cet aspect précis dans notre hypothèse d'un rôle couplée de l'incorporation du fer et de la régulation de l'activité cystéine désulfurase.

### **III.2. La frataxine comme régulateur de l'activité cystéine désulfurase**

Comme nous l'avons déjà introduit, la frataxine a un important effet sur l'activité cystéine désulfurase, dans les modèles eucaryotes comme activateur (Tsai and Barondeau, 2010), et procaryotes comme inhibiteur (Adinolfi et al., 2009). Ces observations qui suggèrent un rôle opposé des orthologues CyaY et FXN s'expliquent en réalité par les différences entre les cystéines désulfurases IscS et NFS1/ISD11 (Bridwell-Rabb et al., 2012). En effet, IscS est une protéine qui a une activité de base très élevée, ce qui n'est pas le cas de NFS1/ISD11. Ainsi des expériences croisées en utilisant CyaY sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU et la FXN sur le complexe IscS/IscU (données personnelles) nous ont permis de constater que la FXN et CyaY sont toutes deux des activateurs ou des inhibiteurs selon le système utilisé. Ces données ont été confirmées et publiées depuis par une autre équipe (Bridwell-Rabb et al., 2012).

L'hypothèse proposée par les équipes d'Annalisa Pastore et de David Barondeau est que la frataxine, par l'intermédiaire éventuel d'ISD11, jouerait des rôles évolutivement opposés d'activateur et d'inhibiteur. Cette hypothèse, qui avait auparavant été rappelée comme très peu probable (Annalisa Pastore - FARA, Strasbourg) du point de vue évolutif, est effectivement surprenante. Il m'apparaît plus réaliste et consensuel de considérer que si la frataxine a un rôle direct et réellement fonctionnel sur l'activité cystéine désulfurase, c'est en tant que régulateur.

Il est cependant tout à fait probable que les effets observés soient simplement des conséquences stériques de la présence de la frataxine. En effet, les modèles du complexe IscS/IscU/CyaY (Prischi et al., 2010b) et NFS1/ISD11/ISCU/FXN suggèrent que la frataxine se trouve à proximité de la boucle dynamique des cystéines désulfurases. En limitant les mouvements de cette boucle par la création d'un espace plus confiné, la frataxine pourrait à la fois diminuer l'activité d'IscS et activer celle de NFS1/ISD11. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que les activités catalytiques post-activation dans le modèle eucaryotes et post-inhibition dans le modèle bactérien sont comparables (Bridwell-Rabb et al., 2012). En effet ceci suggère un environnement enzymatique similaire après la fixation de la frataxine. Nous y reviendrons dans notre dernière hypothèse.

### **III.3. La frataxine comme régulateur de la formation des clusters FeS**

L'une des hypothèses qui ressort de nos travaux est que la frataxine pourrait être un régulateur couplé de l'incorporation du fer et de la production du soufre. En effet, nous avons



pu observer (1) l'effet activateur de la frataxine sur l'activité cystéine désulfurase du complexe NFS1/ISD11/ISCU, et (2) son influence sur l'incorporation du fer lorsqu'il y a une activité cystéine désulfurase au sein du complexe (Colin et al., 2013).

Le phénomène d'activation de l'activité cystéine désulfurase par la frataxine n'est pas nouveau. Par contre, il apparaît clairement que l'existence d'un phénomène de sur-activation n'est pas spécifique du  $Fe^{2+}$ , contrairement à d'autres observations faites précédemment (Tsai and Barondeau, 2010). De plus il n'est pas non plus spécifique de la frataxine puisqu'il peut être observé en son absence (Colin et al., 2013). La raison pour laquelle des ions métalliques sont capables de sur-activer l'activité cystéine désulfurase reste inconnue. Cependant, il est important de noter que contrairement aux ions fer, magnésium et manganèse, l'ion zinc n'a aucun effet de sur-activation. Peut-être est-ce là une conséquence de sa capacité à être coordonné par les cystéines d'ISCU, mais nous n'en avons pour l'instant aucune preuve. Quoiqu'il en soit, il apparaît évident que la frataxine active, ou plutôt régule positivement, la production de sulfures au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN.

Comme mentionné précédemment, nous avons aussi pu montrer que la frataxine influençait l'incorporation du fer au sein du complexe au cours de la biosynthèse des clusters FeS. D'un point de vue mécanistique, ceci suggère que la frataxine « bloquerait » l'entrée du fer en l'absence d'activité cystéine-désulfurase, et l'« activerait » dans le cas inverse. Ceci permettrait donc une arrivée concomitante du fer et du sulfure sur ISCU, et ainsi l'optimisation de la formation des clusters FeS. Cette hypothèse d'un rôle de régulateur (ou synchroniseur) de la formation des clusters FeS est tout à fait séduisante dans la mesure où la frataxine aurait ainsi une fonction « amélioratrice » et non « essentielle » pour la formation des clusters FeS. Ceci serait donc en adéquation avec les observations faites *in vivo* sur les modèles murins délétés en frataxine où, je le rappelle, il existe un taux résiduel de protéines FeS.

Cependant, d'autres hypothèses sont possibles quant au rôle de la frataxine. En effet, il apparaît clair d'un point de vue enzymologique que l'effet de la frataxine sur l'activité cystéine-désulfurase, que ce soit comme activateur ou inhibiteur, est relativement réduit ( $>10x$  sur le  $K_{cat}$ ) (Bridwell-Rabb et al., 2012). Par ailleurs, la fixation du fer pourrait être une conséquence structurale et indirecte de l'activation de la cystéine-désulfurase en présence de la frataxine.

#### **III.4. La frataxine : un stabilisateur du complexe ternaire**

Les données obtenues *in vitro* dans les différents modèles suggèrent clairement que la frataxine se fixe à la fois sur la protéine d'échafaudage et la cystéine désulfurase. Or, nous savons que le complexe ternaire NFS1/ISD11/ISCU est relativement instable. La frataxine pourrait donc jouer le rôle de stabilisateur de l'interaction entre ces deux partenaires. Si nous avons pu avoir une idée de l'affinité de la frataxine pour ces deux sites sur le complexe ternaire, l'impossibilité d'avoir le complexe NFS1/ISD11 nous a empêché de mesurer l'affinité



d'ISCU pour NFS1/ISD11 en absence ou en présence de frataxine. Ces expériences ont cependant été faites dans la bactérie et montrent qu'en présence de CyaY, IscU est nettement plus stable sur IscS (Prischi et al., 2010b).

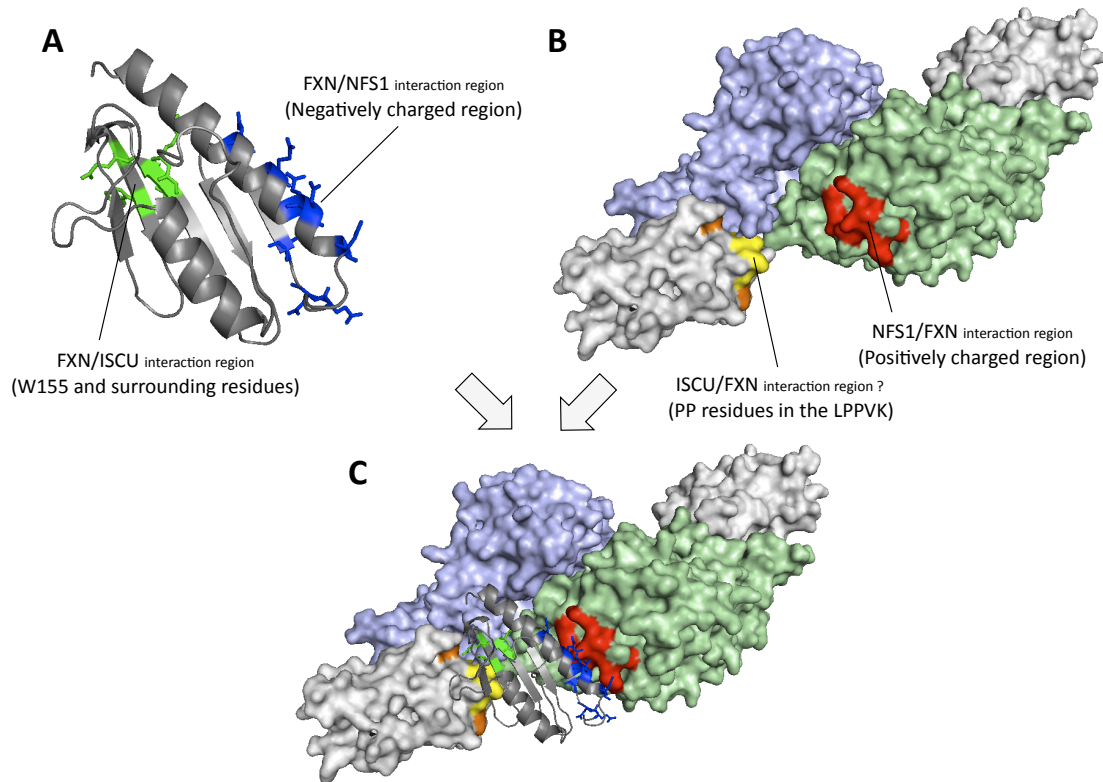
Par ailleurs, les données structurales obtenues par SAXS sur le complexe IscS/IscU/CyaY (Prischi et al., 2010b) et par ultracentrifugation analytique sur les complexes NFS1/ISD11/ISCU et NFS1/ISD11/ISCU/FXN (données personnelles) suggèrent que la présence de la frataxine induirait un changement conformationnel important du complexe, le rendant plus « sphérique ». De ce fait, les cystéines de la protéine d'échafaudage seraient rapprochées du site actif de la cystéine désulfurase, et l'environnement qui contient la boucle flexible serait alors considérablement modifié. Ceci pourrait expliquer l'effet de la frataxine sur l'activité cystéine désulfurase.

Cependant, il faut considérer que le rôle de stabilisateur peut également être simplement une conséquence mécanique de l'interaction de la frataxine avec le complexe ternaire. L'ajout successif de partenaires sur le complexe NFS1/ISD11 le rend de plus en plus stable, d'autant plus que ces partenaires interagissent les uns avec les autres : NFS1/ISD11 avec ISCU, ISCU avec la frataxine et la frataxine avec NFS1/ISD11. En ce sens, ISCU pourrait également être un stabilisateur de l'interaction de la frataxine avec NFS1/ISD11. Si ceci n'est pas observable dans le modèle mammifère, c'est une hypothèse qu'on pourrait formuler à partir des données obtenues dans le modèle bactérien (Prischi et al., 2010b). Par ailleurs, une mutation sur Isu (M107I) permettant de faire le « bypass » fonctionnel de la frataxine a été identifiée (Yoon et al., 2012). Ce résidu est situé à l'opposé de la région d'interaction Isu/Nfs1 et n'est donc pas forcément impliqué dans un phénomène de sur-stabilisation de l'interaction entre Isu et Nfs1, comme peut l'être la mutation D39A (numérotation bactérienne). Au contraire, ce résidu se trouve à proximité du motif LPPVK et est exposé dans la structure IscS/IscU. Ceci pourrait suggérer que la frataxine ne serait pas qu'un stabilisateur.

### **III.5. La structuration d'ISCU au sein du complexe quaternaire**

L'état de structuration d'ISCU (ou IscU) au cours de la biosynthèse des clusters FeS est aujourd'hui au centre de la compréhension du mécanisme de la biosynthèse des clusters FeS (Markley et al., 2013). L'hypothèse d'un rôle de la frataxine dans ce mécanisme prend sa source dans diverses observations convergentes :

(1) La protéine d'échafaudage IscU semble avoir une meilleure affinité pour le complexe IscS lorsqu'elle est sous sa forme « déstructurée » (Markley et al., 2013)). Lors de la biosynthèse des clusters [2Fe-2S], la protéine IscU est progressivement « structurée » puisqu'elle coordine le cluster. La forme structurée d'IscU est ainsi reconnue par la co-chaperonne HscB puis par la suite par HscA au cours du transfert du cluster vers une apoprotéine. L'importance de la structuration d'IscU au cours du processus de formation des clusters semble donc essentielle. Notons la conformation des prolines 100 et 101 du motif



**Figure 49 : Modèle de la fixation de la frataxine sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU**

(A) Les régions d'interactions sont définies par les résidus portant un cercle rouge sur la figure 26. FXN et ISCU : N146-K147-W155 (en vert). FXN/NFS1 : D104-E108-E111-D112-D115-D122-D124 (en bleu). (B) La région d'interaction entre NFS1/FXN est le domaine chargé positivement de NFS1 (en rouge). La région d'interaction entre ISCU et la FXN serait le motif Pro-Pro contenue dans le motif LPPVK (jaune). Les cystéines d'ISCU sont en orange. Le dimère de NFS1 est en vert et bleu pâle. ISCU est en blanc. (C) Modèle du complexe NFS1/(ISD11)/ISCU/FXN.

LPPVK, en « cis » lorsqu'IscU est déstructuré et en « trans » lorsqu'il est structuré (Dai et al., 2012).

(2) Parallèlement, lors de la formation de clusters [4Fe-4S] sur IscU, le transfert sur l'aconitase de ce type de cluster est très réduit et n'est pas activé par HscB/HscA (Unciuleac et al., 2007). Comme l'ont suggéré Denis Dean et Mike Johnson, nous pouvons faire l'hypothèse que lorsqu'IscU possède ce type de cluster, si sa structuration n'est pas optimale, le transfert est inefficace. Cependant, et de manière inattendue et inédite, nous avons pu observer qu'en présence de la frataxine, le cluster [4Fe-4S] contenu dans ISCU était nettement mieux transféré (3x) (Colin et al., 2013). Ceci suggère donc que la frataxine pourrait avoir une influence structurale sur ISCU afin de rendre le cluster plus transférable. (Nous reviendrons en détail sur les résultats concernant les clusters FeS dans la partie suivante).

(3) Bien que nous n'ayons pas d'idée précise de la nature de l'interaction entre la frataxine et ISCU, il apparaît que le tryptophane exposé W155 est clairement impliqué. Or nous savons que la chaîne latérale du tryptophane interagit préférentiellement avec d'autres résidus cycliques (Histidine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane et Proline) ou avec des chaînes latérales hydrophobes (Méthionine, Leucine, Isoleucine) (Samanta et al., 2000). De plus, il est important de rappeler que quelques-unes des classes de domaine de reconnaissance protéine/protéine les plus communes sont celles impliquées dans des interactions entre des tryptophanes et des motifs riches en prolines (Zarrinpar and Lim, 2000). C'est le cas notamment du domaine SH3 ou du micro-domaine WW, reconnaissant pour ce dernier les motifs P-P-x-Y. Or, en utilisant nos modèles structuraux, il apparaît que seuls deux résidus de la protéine d'échafaudage ISCU, qui sont *a priori* à proximité du tryptophane exposé de la frataxine, répondent aux exigences statistiques énoncées ci-dessus. Il s'agit de deux prolines contenues dans le motif LPPVK, motif de reconnaissance par HscA. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où, comme nous l'avons indiqué précédemment, leurs conformations en « cis » ou en « trans » définissent l'état structuré ou non de la protéine d'échafaudage (Colin et al., 2013).

(4) Enfin, il est important de rappeler que les chaperonnes et co-chaperonnes HscA et HscB sont retrouvées quasiment dans tous les organismes vivants, et que leur absence coïncide systématiquement avec l'absence de la frataxine (Huynen et al., 2001). Ceci implique donc une conservation fonctionnelle. Or jusqu'à présent, la frataxine a toujours été présentée comme étant impliquée dans la formation des clusters FeS, et les chaperonnes et co-chaperonnes dans leur transfert. Si la frataxine est impliquée dans la structuration d'ISCU, elle pourrait donc avoir non seulement un rôle dans la formation des clusters FeS mais également dans leur transfert puisque HscB reconnaît préférentiellement la forme structurée de la protéine d'échafaudage.

Si l'on se base sur les différentes observations et conjectures que j'ai citées ci-dessus, on peut proposer l'hypothèse d'un rôle de la frataxine dans la structuration d'ISCU (Figure 49). Cette hypothèse a l'avantage de répondre à un grand nombre d'observations réalisées *in vivo* et *in vitro* :





- La frataxine apparaît comme nécessaire mais pas indispensable à la production optimale des clusters FeS *in vivo*. En interagissant avec le complexe NFS1/ISD11/ISCU et en structurant ISCU, la frataxine pourrait en effet promouvoir la production des clusters. Son absence, cependant, ne l'empêcherait pas.
- *In vitro*, les informations sur le rôle de la frataxine sont contradictoires selon les modèles étudiés : activateur (eucaryotes) ou inhibiteur (procaryotes) de la production du sulfure et des clusters FeS. En suggérant un rôle purement structural pour la frataxine, et compte tenu de la zone d'interaction probable de la frataxine avec le complexe NFS1/ISD11/ISCU, il apparaît plutôt que ces observations sont le résultat d'une modification de l'environnement réactionnel. La frataxine structure la région de formation des clusters FeS et régule soit à la baisse l'activité initialement forte d'IscS, soit à la hausse l'activité initialement réduite de NFS1/ISD11.
- En contrôlant la conformation « cis » ou « trans » d'ISCU par l'intermédiaire d'une interaction entre le tryptophane exposé de la frataxine et le motif LPPVK, le rôle de la frataxine serait fonctionnellement lié à celui des co-chaperonnes et chaperonnes HscB (HSC20) et HscA (GRP75). On suggère donc ainsi un rôle de la frataxine pour le transfert des clusters en plus de celui dans leur biosynthèse.

Bien entendu, certaines limitations sont à considérer pour cette hypothèse. Premièrement, nous suggérons un rôle dans la structuration d'ISCU en nous basant notamment sur l'inefficacité du transfert des clusters [4Fe-4S] sur l'aconitase. Or, les recherches réalisées *in vitro* chez la bactérie montrent que, contrairement à ce qui avait été initialement proposé (Adinolfi et al., 2009), la frataxine ne semble pas avoir un rôle distinctif vis-à-vis du type de cluster synthétisé (Iannuzzi et al., 2011). De plus, *in vivo*, l'absence de frataxine affecte indifféremment les protéines FeS possédant des clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Notre hypothèse n'exclut donc pas la possibilité que la frataxine ait un rôle de structuration d'ISCU y compris lorsque celui-ci possède un cluster [2Fe-2S], même si *in vitro* le transfert est optimal et activé par HscA et HscB en l'absence de frataxine.

D'autre part, il est très difficile d'expliquer le rôle de la frataxine vis-à-vis de l'incorporation du fer au cours de la biosynthèse des clusters FeS en excluant son rôle possible de régulateur (Colin et al., 2013). En effet, ce n'est que lorsque le complexe est « actif » que l'on observe une sur-incorporation de fer sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN. Mais ceci n'est pas fondamentalement en contradiction avec un rôle structurant de la frataxine. En effet, et comme je l'ai proposé pour la régulation de la production du sulfure, la régulation de l'incorporation du fer pourrait être une conséquence mécanique de la structuration d'ISCU.



## IV - La biosynthèse des clusters FeS : questions en suspens

La compréhension du mécanisme de biosynthèse des clusters FeS demeure incomplète. Nous pouvons cependant le résumer sur la forme de la [Figure 50](#) dans l'état actuelle des connaissances. Plusieurs questions précises se posent.

### IV.1. Le fer ou le soufre en premier ?

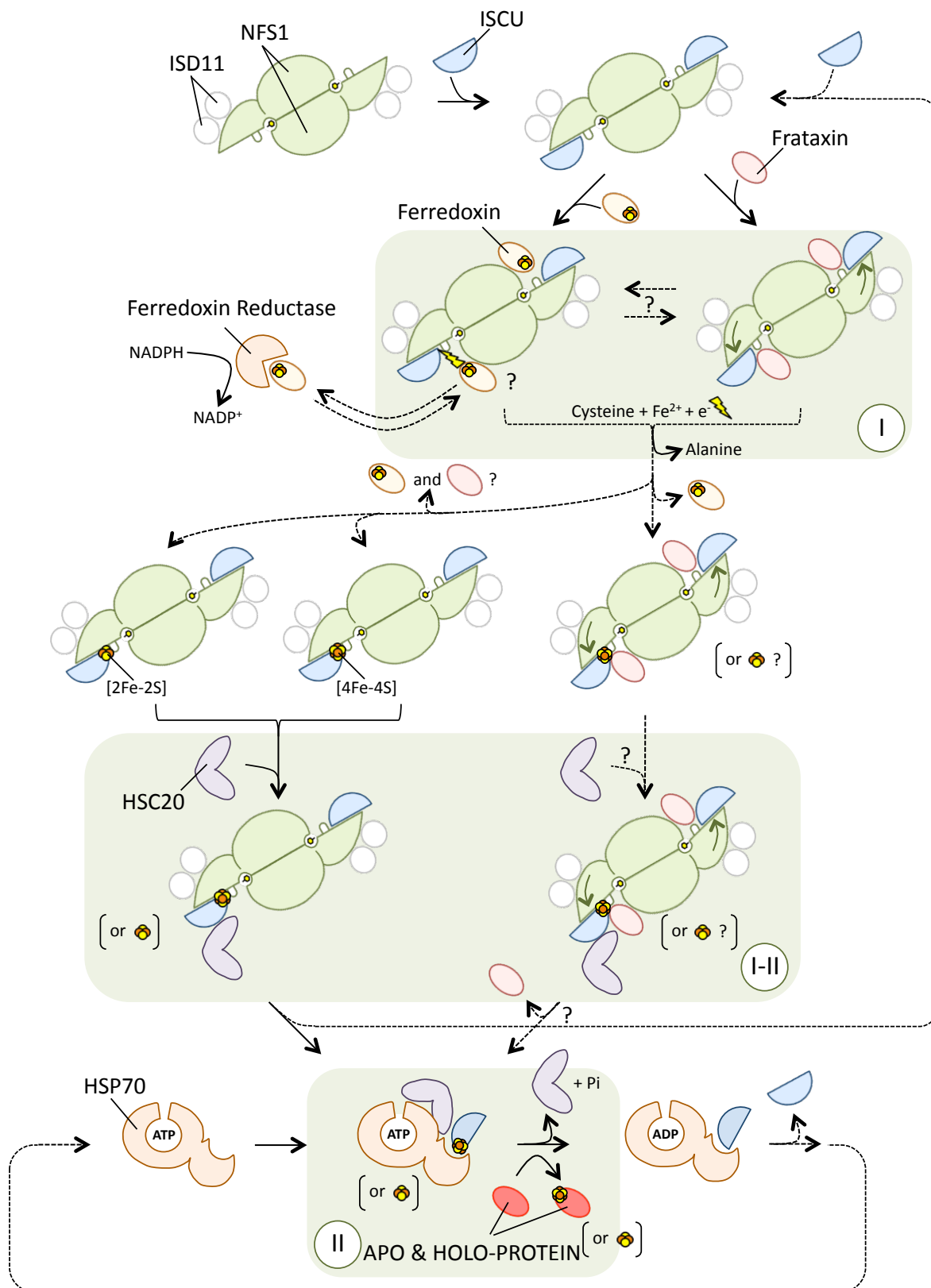
Comme j'ai pu le décrire dans l'introduction, l'ordre d'arrivée des atomes de fer et de soufre au sein du complexe de biosynthèse des clusters FeS est un éternel débat. Les études que nous avons menées nous ont permis de faire les observations suivantes :

- Les complexes possèdent toujours une quantité minimale de soufre, vraisemblablement sous la forme d'un persulfure (Cys-S-SH) sur NFS1 ou ISCU, que l'on évalue à environ un atome par complexe. De plus, lors de la biosynthèse des clusters FeS, l'incorporation du fer au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU/FXN ne se fait qu'après initiation de l'activité cystéine désulfurase. Ceci nous a permis de suggérer que l'incorporation du fer est postérieure à la production de sulfure.
- De manière très reproductible lors des reconstitutions des clusters sur les deux types de complexes NFS1/ISD11/ISCU et NFS1/ISD11/ISCU/FXN, il existe un pool de Fe<sup>2+</sup> labile. Ce pool représente une partie significative du fer contenu dans les complexes, puisqu'il représente généralement plus de 50% de celui-ci (Colin et al., 2013). Nous n'avons à ce jour aucune idée de la localisation de ces atomes de fer qui, comme on peut en faire l'hypothèse, se trouvent mécaniquement à une étape intermédiaire et très précoce de la formation des clusters FeS.

Aussi, s'il nous apparaît vraisemblable que le fer arrive après le sulfure, ou tout du moins de manière synchronisée notamment grâce à la frataxine. L'étude structurale poussée de ces complexes reconstitués pourrait permettre de comprendre bien plus précisément les étapes précoces de la formation des clusters FeS.

### IV.2. Les complexes ternaire et quaternaire et leurs clusters FeS

Lors de nos expériences de reconstitution des clusters FeS sur les complexes ternaire et quaternaire, nous avons pu constater une « non-dissociation » des complexes. Ceci est très important à plusieurs titres : (1) ceci suggère premièrement que la formation de clusters sur ISCU n'entraîne pas sa dissociation de NFS1/ISD11, tout du moins dans nos conditions. (2) Ceci suggère également que la frataxine n'est pas impliquée dans la dissociation du complexe NFS1/ISD11/ISCU dès qu'un cluster est formé sur ISCU, en tous cas en l'absence des chaperonnes et co-chaperonnes.



**Figure 50 :** Proposition d'un modèle théorique du mécanisme de biosynthèse des clusters FeS par la machinerie ISC

Ce modèle est basé les informations disponibles sur l'ensemble des organismes modèles (y compris procaryotes) mais adapté pour correspondre aux eucaryotes supérieurs.

## Complexes formation

- The NFS1 cysteine desulfurase is used as a platform
- ISD11 is bound to the NFS1 (dynamically ?)
- ISCU scaffold interacts with NFS1/ISD11
- Frataxin interacts with NFS1/ISD11/ISCU and induce a structural modification
- or Ferredoxin interacts with NFS1/ISD11 (alone !) and is in competition with Frataxin

I

## FeS cluster biosynthesis

- Sulfur is extracted from Cysteine by the NFS1/ISD11 complex
  - Iron incorporation and sulfur production is activated by Frataxin
  - Electrons are given by Ferredoxin (?), which is reactivated by the Ferredoxin Reductase
  - FeS clusters are built on ISCU, the scaffold protein
- Dynamic equilibrium between Frataxin and Ferredoxin during FeS cluster biosynthesis ?

## FeS containing complexes

- Non-dissociation of the complexes
  - NFS1/ISD11/ISCU complex with [2Fe-2S] or [4Fe-4S]
  - NFS1/ISD11/ISCU/FXN complex with [2Fe-2S]? or [4Fe-4S]
- Only one cluster per complex, by negative-cooperating regulation ?

I-II

## FeS cluster transfer initiation

- FeS cluster containing ISCU is recognized by HSC20 (HscB ortholog)
  - HSC20 binding induces NFS1/ISCU dissociation (?)
- Frataxin helps in the cluster transfert ?

II

## FeS cluster transfer to apo-proteins

- HSP70 is the functional equivalent of HscA (but not the ortholog)
- HSP70 recognize the HSC20/ISCU cluster loaded complex (?)
- and induce cluster transfer in a ATP-dependant mechanism (?)



Par ailleurs, nos conditions expérimentales conduisaient systématiquement à la formation de clusters [4Fe-4S], indépendamment de la présence ou non de la frataxine. Ceci n'est *a priori* pas surprenant dans la mesure où quelque soit le modèle utilisé, lorsque les protéines d'échafaudages (IscU ou ISCU) et les cystéines désulfurases (IscS ou NFS1/ISD11) sont dans un ratio 1:1, la biosynthèse conduit à des clusters [4Fe-4S] (Agar et al., 2000b). Ceci est peut-être la conséquence de l'utilisation de réducteurs non physiologiques, comme le DTT, qui sur-activent l'activité cystéine désulfurase.

Quoi qu'il en soit, ces deux observations peuvent être elles aussi mises en parallèle avec notre hypothèse de structuration d'ISCU. En effet, lorsque IscU possède un cluster [2Fe-2S], il se structure et est à ce titre supposé se dissocier facilement d'IscS. Dans nos conditions expérimentales, ISCU possède systématiquement un cluster [4Fe-4S] et ne se dissocie pas du complexe NFS1/ISD11/ISCU. La présence de la frataxine, qui pourrait être impliquée dans la structuration d'ISCU, n'active pas non plus sa dissociation. Cependant, nous savons que le transfert des clusters [4Fe-4S] vers l'aconitase est facilité. Des expériences complémentaires en utilisant HSC20 (HscB) et GRP75 (HscA) pourraient nous permettre d'avoir une meilleure idée mécanistique du rôle de la frataxine.

De plus, il est important de rappeler que les différentes données disponibles dans la littérature témoignent du rôle vraisemblablement non-spécifique de la frataxine dans la formation des clusters [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (Iannuzzi et al., 2011). L'observation de clusters [2Fe-2S]<sup>+</sup> sur le complexe ternaire uniquement ne témoigne *a priori* que de la plus faible activité catalytique de NFS1/ISD11 en absence de la frataxine. Cependant, la formation de clusters [4Fe-4S] sur ISCU au sein des complexes remet en question l'hypothèse originelle qui suggérait l'association de deux IscU contenant chacun un cluster [2Fe-2S]<sup>+</sup> pour faire un dimère d'IscU contenant un cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (Agar et al., 2000b). En effet, si nous sommes capables de voir l'intermédiaire [2Fe-2S]<sup>+</sup>, ISCU est sous une forme monomérique dans le complexe ternaire et quaternaire et n'est pas dissocié de ceux-ci.

La compréhension exacte de la formation des clusters FeS au sein des complexes de biosynthèse est donc encore loin d'être totale. L'optimisation de procédés permettant un ralentissement très significatif de l'activité cystéine désulfurase, en changeant le type de réducteur ou en l'omettant, devrait permettre d'observer et de caractériser des intermédiaires d'importance mécanistique majeure.

### **IV.3. Asymétrie des complexes**

Parmi les différentes observations surprenantes que nous avons pu faire, celle d'une asymétrie fonctionnelle du complexe est l'une des plus intrigante. En effet, si le caractère opposé des sites actifs de NFS1 a suggéré dès la cristallisation de son homologue IscS un mécanisme séquentiel plutôt que coopératif (Cupp-Vickery, 2003), nous avons pu vérifier expérimentalement un comportement asymétrique, et ceci pour deux raisons. (1) La caractérisation de l'affinité de la frataxine pour le complexe NFS1/ISD11/ISCU par





ultracentrifugation analytique a permis de constater une affinité moindre pour le second site, pourtant théoriquement parfaitement identique. Par ailleurs, nos multiples essais par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) ne nous ont permis d'observer la fixation que d'une frataxine sur le complexe ternaire, suggérant que si une seconde fixation se fait, elle n'est pas thermodynamiquement visible (données personnelles). (2) Par ailleurs, lors des expériences de reconstitution des clusters FeS, nous avons pu observer qu'il n'y avait jamais plus d'un cluster [4Fe-4S] par complexe.

Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'il existe un effet structural de la fixation de la frataxine sur le complexe NFS1/ISD11/ISCU suffisamment important pour qu'il puisse avoir des conséquences, *a priori* inhibitrices, au niveau du second site enzymatique. Ceci n'est cependant pas en inadéquation avec des observations précédemment réalisées sur d'autres enzymes PLP dépendantes (Selbach et al., 2010).

#### IV.4. Origine des électrons

Si l'implication de la ferrédoxine dans le mécanisme de biosynthèse des clusters FeS ne fait pas de doute, son rôle exact est sujet à débat. Aujourd'hui deux hypothèses s'opposent : (1) la ferrédoxine intervient lors de la réduction des clusters [2Fe-2S]<sup>2+</sup> pour former des clusters [2Fe-2S]<sup>+</sup> et promouvoir la formation des [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (Chandramouli et al., 2007). (2) La ferrédoxine intervient directement au début de la biosynthèse du cluster [2Fe-2S], par exemple en réduisant les persulfures sur NFS1 ou ISCU (Kim et al., 2013). Comme je l'ai dit dans l'introduction, la première hypothèse est séduisante dans la mesure où la ferrédoxine est elle-même une protéine FeS avec un cluster [2Fe-2S], car une implication limitée à la maturation des clusters [4Fe-4S] lui évite d'être impliquée dans la formation de son propre cofacteur.

Les études récentes de la ferrédoxine bactérienne au sein du complexe IscS/IscU et les précédentes études menées au sein du complexe NFS1/ISD11/ISCU par Stéphane Schmucker dans notre équipe, montrent qu'il existe un chevauchement intéressant entre la zone de fixation de la frataxine et celle de la ferrédoxine (Yan et al., 2013). Par ailleurs, il apparaît qu'il n'y a pas d'interaction directe entre la ferrédoxine et IscU. Ces différentes observations sont à l'évidence très intéressantes du point de vue mécanistique et nous permettent d'émettre différentes hypothèses :

- (1) La frataxine et la ferrédoxine arrivent l'une après l'autre sur le complexe, dans un ordre précis. Dans la mesure où la ferrédoxine n'interagit visiblement pas avec IscU, il apparaît mécanistiquement plus vraisemblable que la frataxine soit la première. La ferrédoxine arriverait alors par la suite en déplaçant la frataxine, exposant ainsi le cluster en cours de synthèse sur IscU à son propre cluster [2Fe-2S] pour donner un électron. C'est une hypothèse envisageable quel que soit le rôle que l'on donne à la frataxine.



- (2) La frataxine et la ferrédoxine alternent dynamiquement sur le complexe. Cette hypothèse est séduisante si l'on suppose un rôle de donneur de fer pour la frataxine. En effet, la frataxine ne pouvant fixer de grandes quantités de fer (1 à 2 atomes de fer seulement), elle doit nécessairement faire des allers-retours pour se « recharger » en fer. Parallèlement, la ferrédoxine ne pouvant donner qu'un électron à la fois, elle doit, elle aussi, pouvoir dynamiquement aller et venir sur le complexe.

Si mes propres études ne répondent en rien à cette question, il me semble important de faire remarquer que le glutathion, un réducteur physiologique, peu parfaitement remplacer le DTT au cours de l'activité cystéine désulfurase, c'est-à-dire qu'il est expérimentalement capable de réduire les persulfures sur les complexes NFS1/ISD11/ISCU et NFS1/ISD11/ISCU/FXN (données personnelles). Cette hypothèse s'inscrit dans le contexte des observations réalisées dans l'équipe de Mike Johnson quant à l'implication de la ferrédoxine uniquement dans les étapes tardives de la biosynthèse des clusters : la maturation des clusters [4Fe-4S].

## **V - Le logiciel PredISC et la recherche de protéines FeS**

### **V.1. Limites à la recherche de candidats par le logiciel PredISC**

Le domaine des protéines à clusters FeS est en constante évolution et leur nombre est croissant, notamment chez les mammifères. Leur localisation(s) et leur fonction(s) sont extrêmement diverses et laissent présager un développement considérable de ce domaine dans les années à venir. Les recherches que nous avons menées grâce à notre programme PredISC nous ont permis de réaliser à quel point le nombre de protéines contenant des motifs typiques de coordination de clusters FeS est élevé (13.5% des protéines mammifères de swissprot). Ceci dit, il est important de considérer quelques limites à cette approche :

- (1) En basant délibérément notre approche sur les motifs de coordination des clusters à l'échelle de la séquence, nous avons fait l'impasse sur les informations structurales, plus précieuses et plus biologiquement significatives. Cependant, il faut rappeler ici que le nombre de structures disponibles est finalement réduit par rapport au nombre total de protéines (10%). En effet, il y a à ce jour (octobre 2013) un peu moins de 6500 structures de protéines mammifères, pour plus de 65000 séquences protéiques dans la base de données swissprot (mammifère). De plus, il existe très peu de structures de protéines mammifères avec des clusters FeS.
- (2) En se basant uniquement sur des motifs connus, nous supprimons la possibilité de découvrir des protéines FeS inédites. Cependant, et c'est ce qui ressort des travaux sur la construction et l'optimisation des Softsigns, si nous ne nous limitons pas très précisément à ceci et de manière stringente, la quantité de protéines candidates serait pratiquement comparable à la taille de la base de données utilisée pour les rechercher.



- (3) L'existence d'un motif typique de reconnaissance de clusters FeS n'est pas la preuve de la présence d'un cluster FeS. L'exemple le plus frappant est celui des protéines IRP1 et IRP2, deux paralogues qui partagent exactement le même motif. En effet IRP1 (ou aconitase cytosolique) est capable de coordonner un cluster [4Fe-4S], ce qui n'est expérimentalement pas le cas d'IRP2. Ceci suggère qu'il est très compliqué de se limiter uniquement aux motifs de coordination.
- (4) La nécessité de vérifier et de corriger les alignements multiples au cours de la création des « Softsigns », ainsi que de définir soi-même une partie des résidus la composant entraîne un important biais humain. Certes, les ordinateurs ne sont pour l'instant pas capables de faire mieux que ce qu'on leur demande, mais ils ont l'avantage d'être objectifs. Aussi, dans la mesure où il est impossible d'éviter une intervention humaine au cours du processus de création des « Softsigns », il existe une variation difficilement mesurable qui rend les résultats légèrement différents de ceux qu'aurait obtenus un autre utilisateur. Ainsi la grande souplesse du programme PredISC est, à mon avis, également l'une de ses plus grandes faiblesses puisqu'elle limite la possibilité de reproduire deux fois exactement les mêmes résultats. Or la reproductibilité des résultats est essentielle.
- (5) La construction d'arbres phylogénétiques et d'alignements multiples sur les domaines des protéines candidates partageant le même motif est scientifiquement fautive d'un point de vue évolutif. En effet, lorsque les programmes Mafft et Clustal sont utilisés pour réaliser cette analyse, il est important de se rappeler que les candidats n'ont strictement rien à voir. Aussi, ces analyses doivent être prises pour ce qu'elles sont : un moyen mathématique de regrouper ensemble les candidats partageant des motifs dont la similarité dépasse les seules cystéines coordonnant les clusters FeS.
- (6) La création de la liste initiale puis des « softsigns optimisées » est un processus long en comparaison avec le reste. Le logiciel PredISC est effectivement très efficace pour réaliser les recherches, mais il est important de rappeler qu'il ne peut pas réaliser l'ensemble du processus seul. De plus, son utilisation nécessite de bonnes compétences en informatique et une compréhension fine de ses algorithmes. Aussi, le programme n'est en l'état pas facilement utilisable par un biologiste.

## **V.2. La poursuite des recherches bioinformatiques**

Grâce à la création d'une liste de candidats potentiels par l'intermédiaire du logiciel PredISC, nos initiaux ouvrent plusieurs voies complémentaires. Comme nous l'avons dit dans la partie résultats consacrée à la Bioinformatique, la première d'entre-elles est la création d'une base de données qui comprendrait l'ensemble des résultats sous une forme plus ergonomique et intuitive pour les biologistes. Elle apporterait également une très importante plus-value par l'ajout de nombreuses informations spécifiques pour chaque candidat. Par exemple nous pourrions avoir, en plus des caractéristiques fournies par le logiciel PredISC, la localisation et la spécificité tissulaire, l'implication dans des processus cellulaires et/ou des



voies de biosynthèses pour chaque candidat. Ceci rendrait donc non seulement les résultats plus lisibles et plus informatifs, mais également plus facilement exploitables. De plus, la possibilité d'ajouter facilement les motifs de nouvelles protéines FeS récemment découvertes et d'élargir les recherches sur des bases de données plus (ou moins) spécifiques que la sous-partie mammifère de « Swissprot », rend les résultats perpétuellement dynamiques.

D'autres projets de Bioinformatique pourraient également être entrepris, d'une manière complémentaire et totalement perpendiculaire. La possibilité que je retiens serait l'étude des gènes et ARNm codant pour les protéines FeS. Nous ne connaissons actuellement rien sur le mécanisme d'incorporation des clusters dans les protéines FeS. Bien entendu, les transferts de clusters FeS directement des protéines d'échafaudage vers des protéines FeS comme la ferrédoxine ou l'aconitase ont été observées *in vitro*. Cependant, à l'inverse de ces deux contre-exemples, les structures disponibles suggèrent que pour bon nombre des protéines FeS, les clusters sont parfaitement enfouis à l'intérieur des structures. Partant de ce constat, nous pouvons supposer que le mécanisme d'incorporation des clusters FeS et de traduction des ARNm codant pour les protéines FeS pourrait être couplé. De cette manière, les clusters pourraient mécaniquement être incorporés dans les protéines, alors que celles-ci n'ont pas encore adopté leur conformation finale. Si l'on suit la logique de cette hypothèse, on peut donc tout à fait imaginer que les gènes puis les ARNm codant pour les protéines FeS puissent contenir dans leurs régions non traduites des informations communes à l'ensemble des protéines FeS. Rappelons à ce titre que les régions non traduites en 5' et 3' des ARNm sont clairement démontrées comme ayant des rôles fonctionnels importants (Chatterjee and Pal, 2009). Notre liste de protéines FeS initiale serait un excellent point de départ.

### **V.3. Les recherches complémentaires en biologie**

Comme nous l'avons introduit dans la partie résultat de la Bioinformatique, de nombreuses approches biologiques « haut-débit » complémentaires comme le microarrays, le MudPIT ou l'Ironome sont possibles. Bien entendu nous pouvons nous attendre à ce que les faux positifs et faux négatifs soient nombreux pour ces techniques expérimentales, comme c'est le cas pour notre approche Bioinformatique. Cependant identifier des protéines qui possèdent à la fois des motifs typiques de protéines FeS et qui sont très clairement affectées dans des tissus délétés en frataxine, que ce soit au niveau des ARNm, des protéines ou du contenu en fer, pourrait nous livrer des candidats intéressants.

Parallèlement à cela et de manière nettement moins haut-débit, nous pouvons d'ores et déjà nous concentrer sur un petit nombre de candidats dignes d'intérêt (Tableau 7). Il est très remarquable de noter que bon nombre de ces candidats sont en réalité également des protéines à doigts de zinc, comme c'est le cas pour des récepteurs nucléaires RAR ou RXR, ou des facteurs de transcriptions comme TIF1 $\alpha$  ou TAF3. C'est également le cas de MOCS3 que nous avons tenté de caractériser, en vain jusqu'à présent. Rappelons que de nombreuses sous-unités catalytiques d'ADN polymérases, jusqu'alors décrites comme contenant des doigts de





zinc, sont désormais proposées comme étant des protéines FeS (Netz et al., 2012). De plus, si le zinc est stable à l'oxygène et est capable de structurer parfaitement les motifs de coordination des clusters FeS comme c'est le cas pour la protéine d'échafaudage IscU, il ne possède aucunement les caractéristiques physico-chimiques des clusters FeS.

La possibilité de pouvoir valider des protéines FeS candidates à partir des prédictions de notre logiciel PredISC apporterait bien plus qu'une plus-value à nos travaux : cela serait une véritable consécration. De plus, l'éventualité selon laquelle notre étude pourrait également améliorer la compréhension de certaines protéines historiquement étudiées dans notre institut, devrait être extrêmement motivante pour les futurs étudiants, c'est tout du moins mon avis.



## Références bibliographiques

---

- Acquaviva, F., De Biase, I., Nezi, L., Ruggiero, G., Tatangelo, F., Pisano, C., Monticelli, A., Garbi, C., Acquaviva, A.M., and Coccozza, S. (2005). Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *J. Cell Sci.* *118*, 3917–3924.
- Adam, A.C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W., and Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* *25*, 174–183.
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M., and Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* *67*, 549–562.
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S.R., and Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1865–1877.
- Adinolfi, S., Rizzo, F., Masino, L., Nair, M., Martin, S.R., Pastore, A., and Temussi, P. (2004a). Bacterial IscU is a well folded and functional single domain protein. *Eur. J. Biochem.* *271*, 2093–2100.
- Adinolfi, S., Nair, M., Politou, A.S., Bayer, E., Martin, S.R., Temussi, P., and Pastore, A. (2004b). The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: how to increase a protein's stability. *Biochemistry* *43*, 6511–6518.
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S.R., Bonomi, F., and Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 390–396.
- Agar, J.N., Zheng, L., Cash, V.L., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000a). Role of the IscU Protein in Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis: IscS-mediated Assembly of a [Fe 2 S 2 ] Cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 2136–2137.
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000b). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* *39*, 7856–7862.
- Ai, C., Mo, H., Chen, Q., Liu, Y., Tang, L., Du, J., and Zeng, J. (2011). Expression, purification, and characterization of an iron chaperon protein CyaY from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* *62*, 733–738.
- Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A.J., and Craig, E. a (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* *5*, 1096–1101.
- Amela, I., Delicado, P., Gómez, a, Querol, E., and Cedano, J. (2013). A Dynamic Model of the Proteins that Form the Initial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Machinery in Yeast Mitochondria. *Protein J.*
- Artymiuk, P.J., and Green, J. (2006). The double life of aconitase. *Structure* *14*, 2–4.
- Babcock, M.C., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* *276*, 1709–1712.
- Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2008a). Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 1112–1119.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-navarro, M.M., Gualberto, M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., et al. (2008b). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *27*, 1122–1133.
- Bedekovics, T., Gajdos, G.B., Kispal, G., and Isaya, G. (2007). Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY. *FEMS Yeast Res.* *7*, 1276–1284.
- Beinert, H. (1997). Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* (80-. ). *277*, 653–659.
- Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* *5*, 2–15.
- Beinert, H., Kennedy, M.C., and Stout, C.D. (1996). Aconitase as Ironminus signSulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* *96*, 2335–2374.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R., and Bishop, D.F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* *96*, 3256–3264.
- Bencze, K.Z., Yoon, T., Millán-Pacheco, C., Bradley, P.B., Pastor, N., Cowan, J.A., and Stemmler, T.L. (2007). Human frataxin: iron and ferrocyclase binding surface. *Chem. Commun. (Camb)*. 1798–1800.

- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J.T., Jarrett, J.T., and Drennan, C.L. (2004). Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* *303*, 76–79.
- Berrisford, J.M., and Sazanov, L. a (2009). Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.* *284*, 29773–29783.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 111–121.
- Biederbick, A., Stehling, O., Rösser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsässer, H.-P., and Lill, R. (2006). Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5675–5687.
- Bill, E. (2011). Iron-sulfur clusters—new features in enzymes and synthetic models. *Hyperfine Interact.* *205*, 139–147.
- Bitto, E., Bingman, C. a, Bittova, L., Kondrashov, D. a, Bannen, R.M., Fox, B.G., Markley, J.L., and Phillips, G.N. (2008). Structure of human J-type co-chaperone HscB reveals a tetracysteine metal-binding domain. *J. Biol. Chem.* *283*, 30184–30192.
- Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D.T., and Vickery, L.E. (2008). Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* *47*, 12795–12801.
- Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., and Vickery, L.E. (2011). Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange. *Biochemistry* *50*, 9641–9650.
- Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., and Dennis Chasteen, N. (2004). Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *341*, 605–615.
- Branda, S.S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F., and Isaya, G. (1999). Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* *274*, 22763–22769.
- Bridwell-Rabb, J., Winn, A.M., and Barondeau, D.P. (2011). Structure-Function Analysis of Friedreich's Ataxia Mutants Reveals Determinants of Frataxin Binding and Activation of the Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry* *165*.
- Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A., and Barondeau, D.P. (2012). Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry*.
- Bulteau, A.-L., O'Neill, H. a, Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szwedra, L.I. (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* *305*, 242–245.
- Busi, M. V, Zabaleta, E.J., Araya, A., and Gomez-Casati, D.F. (2004). Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* *576*, 141–144.
- Cai, K., Frederick, R.O., Kim, J.H., Reinen, N.M., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2013). Human Mitochondrial Chaperone (mtHSP70) and Cysteine Desulfurase (NFS1) Bind Preferentially to the Disordered Conformation whereas Co-chaperone (HSC20) Binds to the Structured Conformation of the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein (ISCU). *J. Biol. Chem.*
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* (80-. ). *271*, 1423–1427.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., et al. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1771–1780.
- Canal, F., Fosset, C., Chauveau, M.-J., Drapier, J.-C., and Bouton, C. (2007). Regulation of the cysteine desulfurase Nfs1 and the scaffold protein IscU in macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Arch. Biochem. Biophys.* *465*, 282–292.
- De Castro, M., García-Planells, J., Monrós, E., Cañizares, J., Vázquez-Manrique, R.P., Vílchez, J.J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G., et al. (2000). Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum. Genet.* *106*, 86–92.
- Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O., and Isaya, G. (2000). Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J. Biol. Chem.* *275*, 41469–41475.
- Cavadini, P., O'Neill, H. a, Benada, O., and Isaya, G. (2002). Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 217–227.

- Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Levi, S., Verardi, R., Zanella, I., Derosas, M., Ingrassia, R., Corrado, M., and Arosio, P. (2007). RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* *109*, 3552–3559.
- Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006). HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* *45*, 11087–11095.
- Chandramouli, K., Unciuleac, M.-C., Naik, S., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2007). Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* *46*, 6804–6811.
- Chatterjee, S., and Pal, J.K. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell* *101*, 251–262.
- Cho, S.J., Lee, M.G., Yang, J.K., Lee, J.Y., Song, H.K., and Suh, S.W. (2000). Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8932–8937.
- Chowdhury, M.M., Dosche, C., Löhmannsröben, H.-G., and Leimkühler, S. (2012). Dual role of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MOCS3 in tRNA thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in humans. *J. Biol. Chem.* *287*, 17297–17307.
- Ciesielski, S., Schilke, B., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., Joachimiak, A., Marszalek, J., Craig, E. a, and Dutkiewicz, R. (2012). Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe-S Scaffold Isu Is Indispensable In Vivo and Conserved in Evolution. *J. Mol. Biol.*
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe(4)S(4) Cluster Assembly. *J. Am. Chem. Soc.*
- Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Tomassini, B., and Testi, R. (2006). A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* *281*, 16750–16756.
- Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Rufini, A., Tomassini, B., and Testi, R. (2007). In vivo maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 1534–1540.
- Conlan, A.R., Axelrod, H.L., Cohen, A.E., Abresch, E.C., Zuris, J., Yee, D., Nechushtai, R., Jennings, P.A., and Paddock, M.L. (2009). Crystal structure of Miner1: The redox-active 2Fe-2S protein causative in Wolfram Syndrome 2. *J. Mol. Biol.* *392*, 143–153.
- Cook, J.D., Bencze, K.Z., Jankovic, A.D., Crater, A.K., Busch, C.N., Bradley, P.B., Stemmler, A.J., Spaller, M.R., and Stemmler, T.L. (2006). Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* *45*, 7767–7777.
- Cook, J.D., Kondapalli, K.C., Rawat, S., Childs, W.C., Murugesan, Y., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2010). Molecular details of the yeast frataxin-Isu1 interaction during mitochondrial Fe-S cluster assembly. *Biochemistry* *49*, 8756–8765.
- Correia, A.R., Ow, S.Y., Wright, P.C., and Gomes, C.M. (2009). The conserved Trp155 in human frataxin as a hotspot for oxidative stress related chemical modifications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *390*, 1007–1011.
- Correia, A.R., Wang, T., Craig, E.A., and Gomes, C.M. (2010). Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region. *Biochem. J.* *426*, 197–203.
- Cossée, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L., and Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7452–7457.
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschütter, A., et al. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* *45*, 200–206.
- Crooks, D.R., Jeong, S.Y., Tong, W.-H., Ghosh, M.C., Olivierre, H., Haller, R.G., and Rouault, T. a (2012). Tissue specificity of a human mitochondrial disease: differentiation-enhanced mis-splicing of the Fe-S scaffold gene ISCU renders patient cells more sensitive to oxidative stress in ISCU myopathy. *J. Biol. Chem.* *287*, 40119–40130.
- Cupp-Vickery, J.R. (2003). Crystal Structure of IscS, a Cysteine Desulfurase from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* *330*, 1049–1059.
- Cupp-Vickery, J.R., Peterson, J.C., Ta, D.T., and Vickery, L.E. (2004). Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC. *J. Mol. Biol.* *344*, 1265–1278.
- Curie, C., and Briat, J.-F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *54*, 183–206.

- Dai, Z., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2012). Metamorphic protein IscU changes conformation by cis-trans isomerizations of two peptidyl-prolyl peptide bonds. *Biochemistry* *51*, 9595–9602.
- Demple, B., Ding, H., and Jorgensen, M. (2002). Escherichia coli SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide. *Methods Enzymol.* *348*, 355–364.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M., and Shoelson, S.E. (2000). Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* *275*, 30753–30756.
- Ding, H., Yang, J., Coleman, L.C., and Yeung, S. (2007). Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J. Biol. Chem.* *282*, 7997–8004.
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002). A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2635–2643.
- Dürr, A., Cossée, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A., and Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1169–1175.
- Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M., and Pandolfo, M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* *55*, 1752–1753.
- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 171–174.
- Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* *474*, 226–237.
- Forlani, F., Cereda, A., Freuer, A., Nimtz, M., Leimkühler, S., and Pagani, S. (2005). The cysteine-desulfurase IscS promotes the production of the rhodanese RhdA in the persulfurated form. *FEBS Lett.* *579*, 6786–6790.
- Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kieffer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 333–338.
- Fosset, C., Chauveau, M.-J., Guillon, B., Canal, F., Drapier, J.-C., and Bouton, C. (2006). RNA silencing of mitochondrial m-Nfs1 reduces Fe-S enzyme activity both in mitochondria and cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 25398–25406.
- Foury, F. (1999). Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett.* *456*, 281–284.
- Foury, F., Pastore, A., and Trincal, M. (2007). Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO Rep.* *8*, 194–199.
- Frazzon, J. (2003). Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *7*, 166–173.
- Füzéry, A.K., Tonelli, M., Ta, D.T., Cornilescu, G., Vickery, L.E., and Markley, J.L. (2008). Solution structure of the iron-sulfur cluster cochaperone HscB and its binding surface for the iron-sulfur assembly scaffold protein IscU. *Biochemistry* *47*, 9394–9404.
- Füzéry, A.K., Oh, J.J., Ta, D.T., Vickery, L.E., and Markley, J.L. (2011). Three hydrophobic amino acids in Escherichia coli HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex. *BMC Biochem.* *12*, 3.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twesten, R.D., Owen, W.G., and Isaya, G. (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* *41*, 6798–6804.
- Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J. a, Ferreira, G.C., and Isaya, G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 467–479.
- Gakh, O., Bedekovics, T., Duncan, S.F., Smith, D.Y., Berkholz, D.S., and Isaya, G. (2010). Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *285*, 38486–38501.
- Gentry, L.E., Thacker, M. a, Doughty, R., Timkovich, R., and Busenlehner, L.S. (2013). His86 from the N-terminus of frataxin coordinates iron and is required for Fe-S cluster synthesis. *Biochemistry*.

- Gerber, J., Mühlhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* *4*, 906–911.
- Gibson, T.J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., and Bork, P. (1996). Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* *19*, 465–468.
- Gonzalez-Cabo, P., Vázquez-Manrique, R.P., García-Gimeno, M.A., Sanz, P., and Palau, F. (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2091–2098.
- Haldar, S., Paul, S., Joshi, N., Dasgupta, A., and Chattopadhyay, K. (2012). The presence of the iron-sulfur motif is important for the conformational stability of the antiviral protein, Viperin. *PLoS One* *7*, e31797.
- Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain A J. Neurol.* *104*, 589–620.
- He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S. V, Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferredoxin interaction. *Biochemistry* *43*, 16254–16262.
- Hoff, K.G., Silberg, J.J., and Vickery, L.E. (2000). Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 7790–7795.
- Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2003). Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J. Biol. Chem.* *278*, 37582–37589.
- Huang, J., Dizin, E., and Cowan, J.A. (2008). Mapping iron binding sites on human frataxin: implications for cluster assembly on the ISU Fe-S cluster scaffold protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* *13*, 825–836.
- Huber, C., and Wächtershäuser, G. (1998). Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science* *281*, 670–672.
- Huynen, M. a, Snel, B., Bork, P., and Gibson, T.J. (2001). The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2463–2468.
- Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Howes, B.D., Garcia-Serres, R., Clémancey, M., Latour, J.-M., Smulevich, G., and Pastore, A. (2011). The Role of CyaY in Iron Sulfur Cluster Assembly on the *E. coli* IscU Scaffold Protein. *PLoS One* *6*, e21992.
- Imlay, J.A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* *59*, 1073–1082.
- Jhurry, N.D., Chakrabarti, M., McCormick, S.P., Holmes-Hampton, G.P., and Lindahl, P.A. (2012). Biophysical investigation of the ironome of human Jurkat cells and mitochondria. *Biochemistry* *51*, 5276–5284.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 247–281.
- Kaiser, J.T., Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H.D., Steinbacher, S., and Huber, R. (2000). Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* *297*, 451–464.
- Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (1999). IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Biochemistry* *38*, 16561–16568.
- Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (2000). Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J. Biol. Chem.* *275*, 10727–10730.
- Karlberg, T., Schagerlöf, U., Gakh, O., Park, S., Ryde, U., Lindahl, M., Leath, K., Garman, E., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2006). The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* *14*, 1535–1546.
- Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2002). Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5948–5952.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3059–3066.
- Kiley, P.J., and Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 181–185.



- Kim, J.H., Füzéry, A.K., Tonelli, M., Ta, D.T., Westler, W.M., Vickery, L.E., and Markley, J.L. (2009). Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry* *48*, 6062–6071.
- Kim, J.H., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2011). Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *21*, 44521–44526.
- Kim, J.H., Tonelli, M., Kim, T., and Markley, J.L. (2012a). Three-dimensional structure and determinants of stability of the iron-sulfur cluster scaffold protein IscU from *Escherichia coli*. *Biochemistry* *51*, 5557–5563.
- Kim, J.H., Tonelli, M., Frederick, R.O., Chow, D.C.-F., and Markley, J.L. (2012b). Specialized Hsp70 chaperone (HscA) binds preferentially to the disordered form, whereas J-protein (HscB) binds preferentially to the structured form of the iron-sulfur cluster scaffold protein (IscU). *J. Biol. Chem.* *287*, 31406–31413.
- Kim, J.H., Frederick, R.O., Reinen, N.M., Troupis, A.T., and Markley, J.L. (2013). [2Fe-2S]-Ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *J. Am. Chem. Soc.*
- Knight, S.A.B., Sepuri, N.B., Pain, D., and Dancis, A. (1998). Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* *273*, 18389–18393.
- Koeppen, A.H., Davis, A.N., and Morral, J. a (2011). The cerebellar component of Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.*
- Kondapalli, K.C., Kok, N.M., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2008). *Drosophila* frataxin: an iron chaperone during cellular Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry* *47*, 6917–6927.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* *16*, 345–351.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., and Koenig, M. (1998). Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1485–1489.
- Krepinsky, K., and Leimkühler, S. (2007). Site-directed mutagenesis of the active site loop of the rhodanese-like domain of the human molybdopterin synthase sulfurase MOCS3. Major differences in substrate specificity between eukaryotic and bacterial homologs. *FEBS J.* *274*, 2778–2787.
- Kurusu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y., and Hase, T. (2001). Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 117–121.
- Labuda, M., Labuda, D., Miranda, C.J., Poirier, J., Soong, B.W., Barucha, N.E., and Pandolfo, M. (2000). Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology* *54*, 2322–2324.
- Lake, M.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V, and Schindelin, H. (2001). Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* *414*, 325–329.
- Lamarche, J.B., Côté, M., and Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can. J. Neurol. Sci.* *7*, 389–396.
- Lauhon, C.T. (2000). The *iscS* Gene in *Escherichia coli* Is Required for the Biosynthesis of 4-Thiouridine, Thiamin, and NAD. *J. Biol. Chem.* *275*, 20096–20103.
- Lauhon, C.T. (2002). Requirement for *IscS* in Biosynthesis of All Thionucleosides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *184*, 6820–6829.
- Lauhon, C.T., Skovran, E., Urbina, H.D., Downs, D.M., and Vickery, L.E. (2004). Substitutions in an active site loop of *Escherichia coli* *IscS* result in specific defects in Fe-S cluster and thionucleoside biosynthesis in vivo. *J. Biol. Chem.* *279*, 19551–19558.
- Layer, G., Ollagnier de Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.* *281*, 16256–16263.
- Lee, M.G., Cho, S.J., Yang, J.K., Song, H.K., and Suh, S.W. (2000). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Escherichia coli* CyaY, a structural homologue of human frataxin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *56*, 920–921.
- Leidgens, S., De Smet, S., and Foury, F. (2010). Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its beta-sheet. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 276–286.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, S.A.B., Camadro, J.-M., and Dancis, A. (2003). Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum. Mol. Genet.* *12*, 879–889.

- Li, D.S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M.W., and Pandolfo, M. (1999). Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett.* *456*, 13–16.
- Li, K., Tong, W.-H., Hughes, R.M., and Rouault, T. a (2006). Roles of the mammalian cytosolic cysteine desulfurase, ISCS, and scaffold protein, ISCU, in iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *281*, 12344–12351.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* *460*, 831–838.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 133–141.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 457–486.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 669–700.
- Lim, S.C., Friemel, M., Marum, J.E., Tucker, E.J., Bruno, D.L., Riley, L.G., Christodoulou, J., Kirk, E.P., Boneh, A., Degennaro, C., et al. (2013). Mutations in *LYRM4*, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor *ISD11*, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Hum. Mol. Genet.* 1–14.
- Lin, J., Zhou, T., Ye, K., and Wang, J. (2007). Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14640–14645.
- Lippi, M., Passerini, A., Punta, M., Rost, B., and Frasconi, P. (2008). MetalDetector: a web server for predicting metal-binding sites and disulfide bridges in proteins from sequence. *Bioinformatics* *24*, 2094–2095.
- Liu, J., Oganessian, N., Shin, D.-H., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S.-H. (2005). Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein *IscU* in a zinc-bound form. *Proteins* *59*, 875–881.
- Long, S., Jirku, M., Mach, J., Ginger, M.L., Sutak, R., Richardson, D.R., Tachezy, J., and Lukes, J. (2008a). Ancestral roles of eukaryotic frataxin: mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* *69*, 94–109.
- Long, S., Jirku, M., Ayala, F.J., and Lukes, J. (2008b). Mitochondrial localization of human frataxin is necessary but processing is not for rescuing frataxin deficiency in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13468–13473.
- Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W., and Herrmann, J.M.M. (2001). The mitochondrial proteins *Ssq1* and *Jac1* are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J. Mol. Biol.* *307*, 815–825.
- Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, a., Delewski, W., Song, J.-Y., Marszalek, J., Craig, E. a., and Dutkiewicz, R. (2013). Binding of chaperone *Jac1* and cysteine-desulfurase *Nfs1* to the iron-sulfur cluster scaffold *IscU* is mutually exclusive. *J. Biol. Chem.* 0–19.
- Mansy, S.S., Wu, G., Surerus, K.K., and Cowan, J. a (2002). Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Thermotoga maritima* *IscU* is a structured iron-sulfur cluster assembly protein. *J. Biol. Chem.* *277*, 21397–21404.
- Mansy, S.S., Wu, S., and Cowan, J. a (2004). Iron-sulfur cluster biosynthesis: biochemical characterization of the conformational dynamics of *Thermotoga maritima* *IscU* and the relevance for cellular cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *279*, 10469–10475.
- Marelja, Z., Stöcklein, W., Nitz, M., and Leimkühler, S. (2008). A novel role for human *Nfs1* in the cytoplasm: *Nfs1* acts as a sulfur donor for *MOCS3*, a protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 25178–25185.
- Marelja, Z., Mullick Chowdhury, M., Dosche, C., Hille, C., Baumann, O., Löhmannsröben, H.-G., and Leimkühler, S. (2013). The L-cysteine desulfurase *NFS1* is localized in the cytosol where it provides the sulfur for molybdenum cofactor biosynthesis in humans. *PLoS One* *8*, e60869.
- Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2012). Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J. Biol. Chem.* *287*, 4419–4425.
- Marinoni, E.N., de Oliveira, J.S., Nicolet, Y., Raulfs, E.C., Amara, P., Dean, D.R., and Fontecilla-Camps, J.C. (2012). (IscS-IscU)(2) Complex Structures Provide Insights into Fe(2) S(2) Biogenesis and Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1–5.
- Markley, J.L., Kim, J.H., Dai, Z., Bothe, J.R., Cai, K., Frederick, R.O., and Tonelli, M. (2013). Metamorphic protein *IscU* alternates conformations in the course of its role as the scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis and delivery. *FEBS Lett.* *587*, 1172–1179.

- Marmolino, D. (2011). Friedreich's ataxia: Past, present and future. *Brain Res. Rev.* *67*, 311–330.
- Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2651–2658.
- Martelli, A., Napierala, M., and Puccio, H. (2012). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis. Model. Mech.* *5*, 165–176.
- Matthies, A., Rajagopalan, K. V., Mendel, R.R., and Leimkühler, S. (2004). Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5946–5951.
- Matthies, A., Nimtz, M., and 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.
- Mendel, R.R., and Bittner, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 621–635.
- De Michele, G., Perrone, F., Filla, A., Mirante, E., Giordano, M., De Placido, S., and Campanella, G. (1996). Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: a retrospective study on 119 patients. *Neurology* *47*, 1260–1264.
- Mihara, H., Kato, S., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., Kennedy, R. a J.D., Kurihara, T., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Esaki, N. (2002). The iscS gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6679–6683.
- Miseta, a, and Csutora, P. (2000). Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 1232–1239.
- Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., et al. (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1261–1266.
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2025–2036.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* *22*, 4815–4825.
- Musco, G., de Tommasi, T., Stier, G., Kolmerer, B., Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Muskett, F.W., Gibson, T.J., Frenkiel, T.A., and Pastore, A. (1999). Assignment of the 1H, 15N, and 13C resonances of the C-terminal domain of frataxin, the protein responsible for Friedreich ataxia. *J. Biomol. NMR* *15*, 87–88.
- Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S.R., Frenkiel, T., Gibson, T.J., and Pastore, A. (2000). Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure* *8*, 695–707.
- Naamati, A., Regev-Rudzki, N., Galperin, S., Lill, R., and Pines, O. (2009). Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. *J. Biol. Chem.* *284*, 30200–30208.
- Nair, M., Adinolfi, S., Kelly, G., Frenkiel, T.A., and Pastore, A. (2003). NMR assignment of the 1H, 15N and 13C resonances of the E. coli frataxin orthologue, CyaY. *J. Biomol. NMR* *27*, 403–404.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* *12*, 2037–2048.
- Nakai, Y., Nakai, M., Hayashi, H., and Kagamiyama, H. (2001). Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J. Biol. Chem.* *276*, 8314–8320.
- Netz, D.J.A., Stith, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M.J., and Pierik, A.J. (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 125–132.
- Nilsson, K., Lundgren, H.K., Hagervall, T.G., and Bjork, G.R. (2002). The Cysteine Desulfurase IscS Is Required for Synthesis of All Five Thiolated Nucleosides Present in tRNA from Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* *184*, 6830–6835.
- Nuth, M., and Cowan, J. a (2009). Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of IscU-IscS complex formation and a structural model for sulfide delivery to the [2Fe-2S] assembly site. *J. Biol. Inorg. Chem.* *14*, 829–839.
- Nuth, M., Yoon, T., and Cowan, J. a (2002). Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]<sup>2+</sup> cluster core in IscU proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 8774–8775.

- O'Neill, H. a, Gakh, O., and Isaya, G. (2005a). Supramolecular assemblies of human frataxin are formed via subunit-subunit interactions mediated by a non-conserved amino-terminal region. *J. Mol. Biol.* *345*, 433–439.
- O'Neill, H. a, Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S.M., Sampson, M., Ferreira, G.C., and Isaya, G. (2005b). Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* *44*, 537–545.
- Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R.D., and Pandolfo, M. (1998). Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J. Biol. Chem.* *273*, 14588–14595.
- Pandey, A., Yoon, H., Lyver, E.R., Dancis, A., and Pain, D. (2011). Isd11p activates the mitochondrial cysteine desulfurase, Nfs1p. *J. Biol. Chem.* *286*, 38242–38252.
- Pandey, A., Golla, R., Yoon, H., Dancis, A., and Pain, D. (2012). Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe-S cluster synthesis. *Biochem. J.* *448*, 171–187.
- Park, S., Gakh, O., Mooney, S.M., and Isaya, G. (2002). The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J. Biol. Chem.* *277*, 38589–38595.
- Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. a, Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G.C., and Isaya, G. (2003). Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J. Biol. Chem.* *278*, 31340–31351.
- Passerini, A., Lippi, M., and Frascioni, P. (2011). MetalDetector v2.0: predicting the geometry of metal binding sites from protein sequence. *Nucleic Acids Res.* *39*, W288–92.
- Pastore, C., Adinolfi, S., Huynen, M. a, Rybin, V., Martin, S.R., Mayer, M., Bukau, B., and Pastore, A. (2006). YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? *Structure* *14*, 857–867.
- Pastore, C., Franzese, M., Sica, F., Temussi, P., and Pastore, A. (2007). Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein--a study of bacterial frataxin. *FEBS J.* *274*, 4199–4210.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., and Pook, M. a (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* *126 Suppl*, 65–79.
- Plewniak, F. (2003). PipeAlign: a new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3829–3832.
- Porello, S.L., Leyes, A.E., and David, S.S. (1998). Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates. *Biochemistry* *37*, 14756–14764.
- Prischi, F., Giannini, C., Adinolfi, S., and Pastore, A. (2009). The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *FEBS J.* *276*, 6669–6676.
- Prischi, F., Pastore, C., Carroni, M., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Temussi, P., and Pastore, A. (2010a). Of the vulnerability of orphan complex proteins: the case study of the *E. coli* IscU and IscS proteins. *Protein Expr. Purif.* *73*, 161–166.
- Prischi, F., Konarev, P. V, Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2010b). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat. Commun.* *1*, 95.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* *27*, 181–186.
- Radisky, D.C., Babcock, M.C., and Kaplan, J. (1999). The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J. Biol. Chem.* *274*, 4497–4499.
- Ramazzotti, A., Vanmansart, V., and Foury, F. (2004). Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *557*, 215–220.
- Ramelot, T. a, Cort, J.R., Goldsmith-Fischman, S., Kornhaber, G.J., Xiao, R., Shastry, R., Acton, T.B., Honig, B., Montelione, G.T., and Kennedy, M. a (2004). Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site. *J. Mol. Biol.* *344*, 567–583.
- Raulfs, E.C., O'Carroll, I.P., Dos Santos, P.C., Unciuleac, M.-C., and Dean, D.R. (2008). In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8591–8596.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., and Blankenship, R.E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* *21*, 541–554.
- Rees, D.C. (2002). Great metaloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 221–246.

- Rees, D.C., and Howard, J.B. (2003). The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* *300*, 929–931.
- Richards, T. a, and van der Giezen, M. (2006). Evolution of the Isd11-IscS complex reveals a single alpha-proteobacterial endosymbiosis for all eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 1341–1344.
- Richardson, D.R., Huang, M.L., Whitnall, M., Becker, E.M., Ponka, P., and Rahmanto, Y.S. (2010). The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia. *J. Mol. Med. (Berl)*. *88*, 323–329.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* *17*, 215–217.
- Samanta, U., Pal, D., and Chakrabarti, P. (2000). Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins* *38*, 288–300.
- Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J.-M., and Lesuisse, E. (2010). Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 651–690.
- Sazanov, L. a, and Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* *311*, 1430–1436.
- Schagerlöf, U., Elmlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2008). Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer. *Biochemistry* *47*, 4948–4954.
- Schmidt, S., Strub, a, Röttgers, K., Zufall, N., and Voos, W. (2001). The two mitochondrial heat shock proteins 70, Ssc1 and Ssq1, compete for the cochaperone Mge1. *J. Mol. Biol.* *313*, 13–26.
- Schmitz, J., Chowdhury, M.M., Hänzelmann, P., Nimtz, M., Lee, E.-Y., Schindelin, H., and Leimkühler, S. (2008). The sulfurtransferase activity of Uba4 presents a link between ubiquitin-like protein conjugation and activation of sulfur carrier proteins. *Biochemistry* *47*, 6479–6489.
- Schmucker, S., and Puccio, H. (2010). Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum. Mol. Genet.* *19*, R103–110.
- Schmucker, S., Argentini, M., Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 3521–3531.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* *6*, e16199.
- Schulz, J.B., Dehmer, T., Schöls, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Bürk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., et al. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* *55*, 1719–1721.
- Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., and Kiley, P.J. (2000). The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 9009–9014.
- Schwarz, G., Mendel, R.R., and Ribbe, M.W. (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* *460*, 839–847.
- Seguin, A., Sutak, R., Bulteau, A., Garcia-Serres, R., Oddou, J., Lefevre, S., Santos, R., Dancis, A., Camadro, J., Latour, J., et al. (2010). Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* *1802*, 531–538.
- Selbach, B., Earles, E., and Dos Santos, P.C. (2010). Kinetic analysis of the bisubstrate cysteine desulfurase SufS from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* *49*, 8794–8802.
- Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J.-C., Koenig, M., et al. (2005). Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 463–474.
- Shakamuri, P., Zhang, B., and Johnson, M.K. (2012). Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 15213–15216.
- Shan, Y., and Cortopassi, G. (2011). HSC20 interacts with Frataxin and is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *1*–41.
- Shan, Y., Napoli, E., and Cortopassi, G. (2007). Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 929–941.

- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.-P., Mühlhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11775–11780.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroja, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M.E., and Cygler, M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* *8*, e1000354.
- Shi, W., Punta, M., Bohon, J., Sauder, J.M., D’Mello, R., Sullivan, M., Toomey, J., Abel, D., Lippi, M., Passerini, A., et al. (2011). Characterization of metalloproteins by high-throughput X-ray absorption spectroscopy. *Genome Res.* *21*, 898–907.
- Shi, Y., Ghosh, M.C., Tong, W.-H., and Rouault, T. a (2009). Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3014–3025.
- Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D.R., and Rouault, T. a (2012). Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 484–492.
- Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2007). Characterization and crystallization of an IscU-type scaffold protein with bound [2Fe-2S] cluster from the hyperthermophile, *aquifex aeolicus*. *J. Biochem.* *142*, 577–586.
- Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008). The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Mol. Biol.* *383*, 133–143.
- Shoichet, S.A., Bäumer, A.T., Stamenkovic, D., Sauer, H., Pfeiffer, A.F.H., Kahn, C.R., Müller-Wieland, D., Richter, C., and Ristow, M. (2002). Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 815–821.
- Silberg, J.J., Tapley, T.L., Hoff, K.G., and Vickery, L.E. (2004). Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU. *J. Biol. Chem.* *279*, 53924–53931.
- Skovran, E., Lauhon, C.T., and Downs, D.M. (2004). Lack of YggX results in chronic oxidative stress and uncovers subtle defects in Fe-S cluster metabolism in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* *186*, 7626–7634.
- Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2001). Sulfur Transfer from IscS to IscU: The First Step in Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 11103–11104.
- Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2005). Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett.* *579*, 5236–5240.
- Söderberg, C. a G., Shkumatov, A. V., Rajan, S., Gakh, O., Svergun, D.I., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2011). Oligomerization Propensity and Flexibility of Yeast Frataxin Studied by X-ray Crystallography and Small-Angle X-ray Scattering. *J. Mol. Biol.* *783*–797.
- Stehling, O., and Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, 1–17.
- Stehling, O., Elsässer, H.-P., Brückel, B., Mühlhoff, U., and Lill, R. (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 3007–3015.
- Terali, K., Beavil, R.L., Pickersgill, R.W., and van der Giezen, M. (2013). The effect of Isd11 on the quaternary structure of Nfs1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Teschner, J., Lachmann, N., Schulze, J., Geisler, M., Selbach, K., Santamaria-Araujo, J., Balk, J., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2010). A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell* *22*, 468–480.
- Thompson, J.D., Plewniak, F., Ripp, R., Thierry, J.C., and Poch, O. (2001). Towards a reliable objective function for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* *314*, 937–951.
- Tsai, C.-L., and Barondeau, D.P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* *49*, 9132–9139.
- Tsai, C., Bridwell-Rabb, J., and Barondeau, D.P. (2011). Friedreich’s Ataxia Variants I154F and W155R Diminish Frataxin-Based Activation of the Iron-Sulfur Cluster Assembly Complex. *Biochemistry* *50*, 6478–6487.

- Unciuleac, M.-C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2007). In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* *46*, 6812–6821.
- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., and Vickery, L.E. (2001). Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.* *276*, 44521–44526.
- Urbina, H.D., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2002). Preliminary crystallographic analysis of the cysteine desulfurase IscS from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *58*, 1224–1225.
- Vickery, L.E., and Cupp-Vickery, J.R. (2007). Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *42*, 95–111.
- Vivas, E., Skovran, E., and Downs, D.M. (2006). *Salmonella enterica* strains lacking the frataxin homolog CyaY show defects in Fe-S cluster metabolism in vivo. *J. Bacteriol.* *188*, 1175–1179.
- Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J., and Craig, E.A. (2000). Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3677–3684.
- Voisine, C., Cheng, Y.C., Ohlson, M., Schilke, B., Hoff, K., Beinert, H., Marszalek, J., and Craig, E.A. (2001). Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1483–1488.
- Walters, M.A., Roche, C.L., Rheingold, A.L., and Kassel, S.W. (2005). N-H...S hydrogen bonds in a ferredoxin model. *Inorg. Chem.* *44*, 3777–3779.
- Wang, T., and Craig, E. a (2008). Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *J. Biol. Chem.* *283*, 12674–12679.
- Watson, H.M., Gentry, L.E., Asuru, A.P., Wang, Y., Marcus, S., and Busenlehner, L.S. (2012). Heterotrifunctional chemical cross-linking mass spectrometry confirms physical interaction between human frataxin and ISU. *Biochemistry* *51*, 6889–6891.
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G.M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M.B.D., Bachovchin, D. a, Mowen, K., Baker, D., and Cravatt, B.F. (2010a). Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* *468*, 790–795.
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G.M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M.B.D., Bachovchin, D. a, Mowen, K., Baker, D., and Cravatt, B.F. (2010b). Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* *468*, 790–795.
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Mühlenhoff, U., Lill, R., et al. (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* *25*, 184–195.
- Wu, X., Alexander, P.B., He, Y., Kikkawa, M., Vogel, P.D., and McKnight, S.L. (2005). Mammalian sprouty proteins assemble into large monodisperse particles having the properties of intracellular nanobatteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14058–14062.
- Xu, X.M., and Møller, S.G. (2011). Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 271–307.
- Yan, R., Konarev, P. V, Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S.R., Py, B., Barras, F., et al. (2013). Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J. Biol. Chem.*
- Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* *49*, 4945–4956.
- Yoon, T., and Cowan, J. a (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 6078–6084.
- Yoon, T., and Cowan, J. a (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 25943–25946.
- Yoon, H., Golla, R., Lesuisse, E., Pain, J., Donald, J.E., Lyver, E.R., Pain, D., and Dancis, A. (2012). Mutation in the Fe-S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion. *Biochem. J.* *441*, 473–480.
- Yoon, T., Dizin, E., and Cowan, J. a (2007). N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: regulation of iron binding and complex formation with target proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* *12*, 535–542.
- Zarrinpar, a, and Lim, W. a (2000). Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 611–613.

Zhang, W., Urban, A., Mihara, H., Leimkühler, S., Kurihara, T., and Esaki, N. (2010). IscS functions as a primary sulfur-donating enzyme by interacting specifically with MoeB and MoaD in the biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *285*, 2302–2308.





### **Annexe 1: Rôle cellulaire essentiel de la frataxine par l'intermédiaire d'une interaction avec le complexe NFS1/ISD11/ISCU**

#### **II.1. Contexte de l'étude**

Le déficit primaire en activité des enzymes à noyaux FeS dans les souris conditionnelles délétées (Fxn) développée au laboratoire suggère que la frataxine a un rôle primordiale dans la biosynthèse des clusters FeS. Par ailleurs, différentes publications font état d'interaction entre la Frataxine et différents membres de la biosynthèse des clusters FeS, notamment NFS1, ISD11 et ISCU. Certaines études dans les modèles levures et bactéries font également état de l'existence d'interactions multiples, sous la forme de complexe. Cependant, l'identification précise de(s) interacteur(s) direct(s) de la frataxine est lacunaire. La fonction exacte de la frataxine est quant à elle sujette à controverse.

#### **II.2. Questions biologiques**

- Qui sont les interacteurs de la frataxine ?
- Quel est le ou les interacteur(s) exact(s) de la frataxine au sein de la machinerie ISC ?
- Quelle est la zone d'interaction de la frataxine avec les membres de cette machinerie ?
- Quel peut être le rôle de la frataxine dans cette machinerie ?
- *Parallèlement : quelle maturation et quel degré d'oligomérisation sont essentiels in vivo ?*

#### **II.3. Conclusions des résultats**

Les expériences réalisées par Stéphane Schmucker et ses collaborateurs ont permis de démontrer par différentes approches complémentaires que les seuls interacteurs de la frataxine sont les protéines NFS1, ISD11 et ISCU. Ces trois protéines forment un complexe ternaire, NFS1/ISD11/ISCU, avec lequel la frataxine interagit. L'absence de l'un de ses membres rompt toute interaction. Différents résidus de la première hélice  $\alpha$  et du feuillet  $\beta$  sont essentiels pour former ce complexe quaternaire NFS1/ISD11/ISCU/FXN, dont nous connaissons la stœchiométrie. Le complexe est relativement stable et semble pouvoir être co-purifié avec un cluster FeS. Le rôle de la frataxine pourrait être de stabiliser le complexe ternaire au cours de la biosynthèse des clusters FeS. A titre personnel, j'ai participé très partiellement à cette étude en isolant pour la première fois du complexe ternaire NFS1/ISD11/ISCU. Les essais d'alors permettaient de montrer la grande difficulté de purification de ce complexe, y compris en utilisant un mutant D72A qui stabilisait visiblement l'interaction avec NFS1/ISD11.



# Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex

Stéphane Schmucker<sup>1,2,3,4,5</sup>, Alain Martelli<sup>1,2,3,4,5</sup>, Florent Colin<sup>1,2,3,4,5</sup>, Adeline Page<sup>1,2,3,4</sup>, Marie Wattenhofer-Donzé<sup>1,2,3,4,5</sup>, Laurence Reutenauer<sup>1,2,3,4,5</sup>, Héléne Puccio<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

**1** Department of Translational Medicine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France, **2** Inserm U596, Illkirch, France, **3** CNRS UMR7104, Illkirch, France, **4** Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **5** Chaire de Génétique Humaine, Collège de France, Illkirch, France

## Abstract

**Background:** Frataxin, the mitochondrial protein deficient in Friedreich ataxia, a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder, is thought to be involved in multiple iron-dependent mitochondrial pathways. In particular, frataxin plays an important role in the formation of iron-sulfur (Fe-S) clusters biogenesis.

**Methodology/Principal Findings:** We present data providing new insights into the interactions of mammalian frataxin with the Fe-S assembly complex by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. Through immunoprecipitation experiments, we show that the main endogenous interactors of a recombinant mature human frataxin are ISCU, NFS1 and ISD11, the components of the core Fe-S assembly complex. Furthermore, using a heterologous expression system, we demonstrate that mammalian frataxin interacts with the preformed core complex, rather than with the individual components. The quaternary complex can be isolated in a stable form and has a molecular mass of  $\approx 190$  kDa. Finally, we demonstrate that the mature human FXN<sub>81–210</sub> form of frataxin is the essential functional form *in vivo*.

**Conclusions/Significance:** Our results suggest that the interaction of frataxin with the core ISCU/NFS1/ISD11 complex most likely defines the essential function of frataxin. Our results provide new elements important for further understanding the early steps of *de novo* Fe-S cluster biosynthesis.

**Citation:** Schmucker S, Martelli A, Colin F, Page A, Wattenhofer-Donzé M, et al. (2011) Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. PLoS ONE 6(1): e16199. doi:10.1371/journal.pone.0016199

**Editor:** Francesc Palau, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid - Instituto de Biomedicina de Valencia, Spain

**Received:** September 30, 2010; **Accepted:** December 7, 2010; **Published:** January 26, 2011

**Copyright:** © 2011 Schmucker et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the French National Agency for Research (ANR-05-MRAR-013-01) and the EC under the European Research Council (ERC) grant 206634/ISCATAXIA and under the FP7 grant 242193/EFACTS to H.P. S.S. was supported by the French Ministry for Research (MRT award), A.M. by the American Friedreich Ataxia Research Alliance, and M.W.D. by the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: hpuccio@igbmc.fr

## Introduction

Human frataxin is the protein deficient in Friedreich ataxia (FRDA), a devastating autosomal recessive neurodegenerative disease associated with hypertrophic cardiomyopathy, affecting 1/40,000 in the caucasian population [1,2]. Frataxin is a highly conserved mitochondrial protein from bacteria to humans [2,3]. Genetic and biochemical studies support a role of frataxin as a multifunctional protein in different iron-dependent mitochondrial pathways [2,3], through its ability to bind iron *in vitro* [4,5] and to deliver iron to different acceptors [6,7]. Moreover, binding of iron can trigger frataxin oligomerization *in vitro*, a process that was proposed to scavenge toxic iron in a bioavailable form and to be essential for frataxin function [8]. Both monomeric and oligomeric forms of frataxin were shown to interact with various potential iron acceptors. Frataxin was shown to interact *in vitro* with ferrocyclase and to provide the iron that is needed in the last step of heme biosynthesis [7,9]. Frataxin was also proposed to interact with mitochondrial aconitase, a Fe-S-containing protein, providing protection against the disassembly of the Fe-S cluster by facilitating

iron transfer to aconitase [10]. Similarly, and more extensively, both monomeric and oligomeric forms of frataxin were proposed to be the iron donor protein for *de novo* Fe-S cluster biosynthesis [6,11–16].

Fe-S clusters are critical prosthetic groups present in proteins involved in essential cellular processes ranging from nuclear genome stability, protein translation to mitochondrial metabolism [17]. Within the past decade, the biogenesis of Fe-S proteins has been extensively studied in bacteria and yeast demonstrating that it is a complex process involving multiple highly conserved components [17,18]. *De novo* Fe-S cluster assembly, a mitochondrial process in eukaryotes, relies on the assembly of a Fe-S cluster on a scaffold protein (IscU (bacteria), Isu1 (yeast), ISCU (mammalian)) from inorganic iron and sulfur, followed by the transfer of the scaffold-bound Fe-S cluster to the target apoproteins. Both the synthesis and the final transfer to apoproteins require the help of additional proteins. The sulfur is provided through a persulfide intermediate by a pyridoxal phosphate-dependent cysteine desulfurase, IscS in bacteria and the Nfs1/Isd11 complex in eukaryotes, that interacts with the scaffold protein to form a complex in which Fe-S cluster biosynthesis was proposed to occur *in vivo* [19]. The exact function of

the eukaryotic protein Isd11 is unknown, but it has been proposed to stabilize Nfs1 through a direct interaction [20,21]. The bacterial, yeast and human frataxins (CyaY, Yfh1 and FXN, respectively) were shown to interact with multiple core components of the biosynthesis machinery [11–16]. Furthermore, *in vitro*, iron loaded human frataxin was shown to deliver iron to ISCU [6]. However, how frataxin interacts with the Fe-S cluster biosynthesis components remains unclear as direct one-to-one interactions with each component were reported (IscS [12,22], IscU/Isu1 [6,11,16] or ISD11/Isd11 [14,15]). Finally, the iron-donor function of frataxin has recently been challenged as *in vitro* kinetic studies of Fe-S cluster biosynthesis using the bacterial components revealed that CyaY behaves as an iron-dependent inhibitor of Fe-S cluster assembly through a specific interaction with IscS [22]. Additional experiments are thus required to clarify both the function(s) and the molecular network(s) of the frataxin protein.

To obtain a comprehensive insight into the multiple functions of frataxin, we decided to identify and characterize the interactions of human frataxin. In the present work, we show that endogenous mitochondrial ISCU, NFS1, and ISD11 are the main interactors of frataxin. Using complementary *in vitro* and *in vivo* experiments, we infer that the essential function of mammalian frataxin consists in interacting with the preformed ISCU/NFS1/ISD11 complex, forming a  $\approx$ 190 kDa quaternary complex that can be isolated in a stable form. Finally, we demonstrate that the function of frataxin is sustained *in vivo* by the mature and monomeric form of frataxin.

## Results

### The Fe-S cluster biosynthesis machinery components NFS1, ISCU and ISD11 are the main interactors of mature frataxin

We searched for the interacting partners of human frataxin by coupling immunoprecipitation (IP) with mass spectrometry analysis. Due to competition between the immunoprecipitating 1G2 antibody and interactors, IP of endogenous frataxin failed to identify protein partners (data not shown), with the exception of the mitochondrial processing peptidase (MPP $\beta$ ) involved in the maturation of frataxin [23]. Therefore, IP was performed from HeLa mitochondrial extracts expressing a recombinant human frataxin with a C-terminal flag epitope (hFXN-Flag). As reported, three forms of frataxin, the precursor (25 kDa), the intermediate (19kDa) and the mature (14 kDa) forms [24] were specifically immunoprecipitated from the corresponding HeLa mitochondrial fractions using an anti-Flag antibody (data not shown). Mass spectrometry analysis identified only four common proteins (ISCU, NFS1, ISD11 and MPP $\beta$ ) from two independent experiments that specifically co-immunoprecipitated with hFXN-Flag, with an average coverage ranging from 3–61% (Fig 1A and Table S1). The four proteins were not detected in the negative control in contrast to the mitochondrial HSPA9 and HSPD1 chaperones (Table S1). The specific interaction with endogenous ISCU and NFS1 was confirmed by western blot analysis (Fig 1B). Unfortunately, the available ISD11 antibody did not detect the endogenous ISD11 from mitochondrial HeLa cell extract.

To further confirm these interactions, we performed GST pull-down experiments from HeLa mitochondrial extracts using the mature form of human frataxin (aa 81–210) fused to an N-terminal GST (GST-hFXN<sub>81–210</sub>). A specific interaction between frataxin and endogenous ISCU and NFS1 was detected by western blot (Fig 1C), in agreement with the IP experiments. Interestingly, the addition of the 1G2 monoclonal antibody, which recognizes an epitope located in the sequence encoded by exon 4 of frataxin, completely abolished the interaction with ISCU and NFS1 (Fig

S1A), suggesting a role of this conserved region in the interaction. No difference in interaction with ISCU and NFS1 was detected with the intermediate (GST-hFXN<sub>42–210</sub>) and mature (GST-hFXN<sub>81–210</sub>) forms of frataxin in GST-pull down experiments (Fig S1B), indicating that the site of interaction with the complex is fully comprised within the sequence of the mature form. Therefore, all further experiments were performed with the recombinant mature form of frataxin.

Interestingly, mitochondrial aconitase or ferrochelatase were not detected in the IP and the GST pull-down eluates, despite de presence of both proteins in the soluble input fraction (Fig 1B and 1C). As the interaction between frataxin and mitochondrial aconitase was shown to be promoted by hydrogen peroxide/citrate treatments [10], IP experiments were carried out under these prooxidant conditions. Whether hFXN-Flag or endogenous mitochondrial aconitase were used as bait for IP, no interaction between frataxin and aconitase was observed (Fig S2).

Our results clearly show that the main interactors from mitochondrial HeLa cell extract of a C-terminal or N-terminal tagged human mature frataxin (hFXN<sub>81–210</sub>) are the core components of the *de novo* Fe-S cluster biosynthesis, ISCU, NFS1 and ISD11.

### Frataxin interacts with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 complex

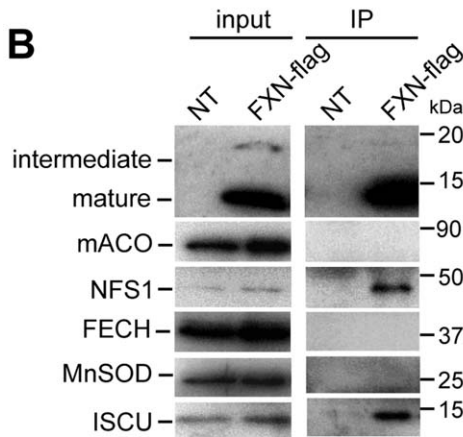
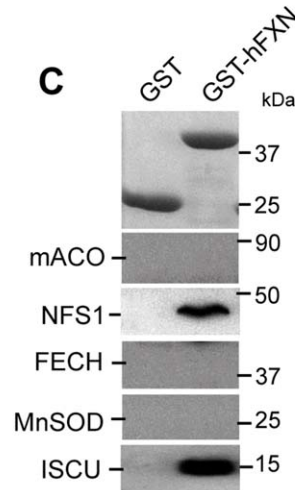
To determine which component of the ISCU/NFS1/ISD11 complex is the direct partner of frataxin, we co-expressed the mature form of the murine homologues in multiple combinations in the bacteria, followed by GST purification. For all bacterial expressed recombinant proteins (GST or His-tagged), the mitochondrial targeting sequence was removed from FXN, NFS1 and ISCU. Each construct expressed soluble protein in bacteria when expressed alone or in combination (Fig S3A). When GST-mFXN was co-expressed either with mISCU alone or with mNFS1/mISD11 or mNFS1/mISCU, no co-purification was detected (Fig 2A). It is only when GST-mFXN, mISCU, mNFS1 and mISD11 were co-expressed that a co-purification of all four proteins was observed (Fig 2A). These results demonstrate that frataxin is able to interact with co-expressed ISCU, NFS, ISD11 proteins and suggest that frataxin interacts with a ISCU/NFS1/ISD11 complex rather than with individual components. As mNFS1/mISD11 are the limiting factors due to lower expression and insolubility in bacteria compared to GST-mFXN and mISCU (data not shown), little complex was purified compared to the large excess of GST-mFXN. However, when a limiting amount of purified GST-mFXN was used to pull-down the complex from a bacterial extract expressing mISCU/mNFS1/mISD11, the quaternary complex could be isolated at nearly stoichiometric levels (Fig S3B). In the absence of mISD11, neither the quaternary nor the ternary complex formed (Fig. 2A), further suggesting that ISD11 is important for NFS1 stability.

Native PAGE analysis of both bacterial co-purification (Fig 2B) and GST-hFXN pull-down eluates obtained with endogenous ISCU, NFS1 and ISD11 from HeLa mitochondrial extracts (Fig 2C) revealed the presence of one major complex containing only the four proteins as verified by mass spectrometry (Fig. 2C) and western blot (data not shown), further demonstrating the presence of a quaternary complex. The identification of endogenously expressed ISD11 in the native complex further confirmed the original co-IP experiments. When isolated from bacterial co-expression, the quaternary complex could be easily concentrated to 5 $\mu$ g/ $\mu$ l, without precipitation.

While frataxin only interacts in a quaternary complex, the ternary complex mISCU/mNFS1/mISD11 could be isolated in the absence of frataxin. Indeed, when mISCU-HIS, mNFS1 and

**A**

Accession number	Protein	Number of peptides	Coverage (%)	Score
Q16595	Frataxin	2 - 9	11.9 - 61.9	16.72 - 137.04
Q9Y697	NFS1	1 - 4	3.06 - 13.13	5.68 - 22.55
Q9HD34	ISD11	1	15.38	6.4 - 8.9
Q9H1K1	ISCU	1	7.19 - 10.18	2.96 - 9.42
O75439	MPP $\beta$	1 - 2	3.89 - 6.34	7.69 - 13.51

**B****C**

**Figure 1. Human frataxin interacts specifically with ISCU, NFS1 and ISD11.** (A) Mass spectrometry analysis of proteins identified by co-IP with FLAG-tagged frataxin from HeLa mitochondrial enriched fractions. Results represent the proteins specifically identified common to two independent experiments with hFXN-FLAG expressing cells compared to non-transfected cells. Peptides were selected with a stringent filter to avoid a maximum of false positives. Coverage represents the percentage of sequence matching with peptides found in the analysis. An example of complete results for one experiment is given in Table S1. (B) IP obtained in (A) were analyzed by Western blot using specific antibodies against frataxin (intermediate and mature), mitochondrial aconitase (mACO), NFS1, ferrochelatase (FECH), MnSOD and ISCU. MnSOD was used as a control to evaluate non-specific binding on the beads. Inputs correspond to 5 $\mu$ g of mitochondrial HeLa extracts. (C) GST pull-down using GST-hFXN (aa 81–210) and HeLa mitochondrial extracts. Eluted fractions were analyzed by Western blot as in (B) or by coomassie blue staining to detect GST and GST-hFXN. doi:10.1371/journal.pone.0016199.g001

mISD11 were co-expressed, mNFS1 and mISD11 co-purified with mISCU-HIS (Fig 2D). Furthermore, pull-down experiments using GST-mFXN as a bait demonstrated an interaction between GST-mFXN and the pre-purified mISCU-HIS/mNFS1/mISD11 complex (Fig 2D). In contrast to the quaternary complex, the ternary mISCU/mNFS1/mISD11 complex was susceptible to aggregation upon concentration.

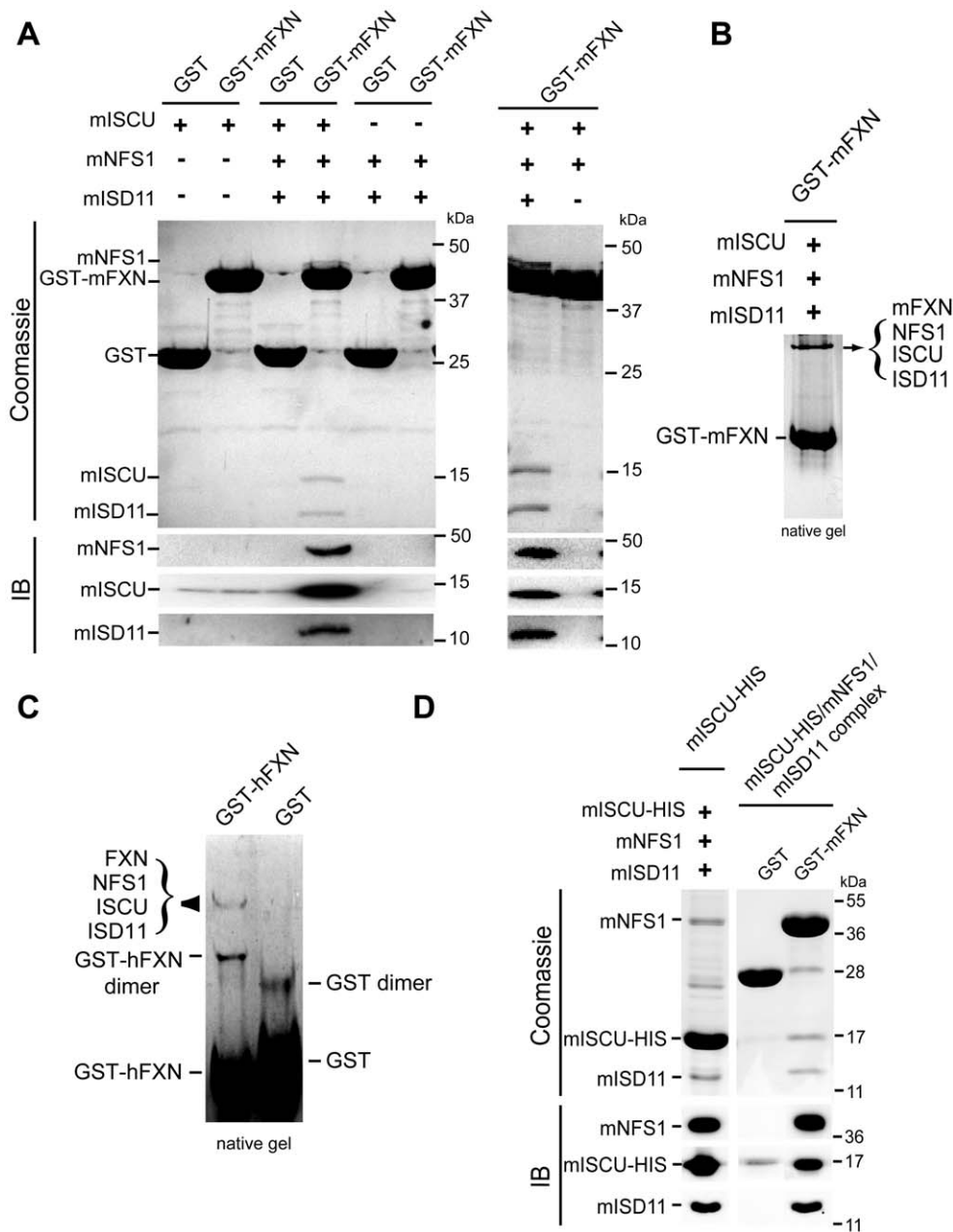
Contrary to the reported data in yeast demonstrating that iron reversibly increase the binding of Yfh1 to Isu1/Nfs1 [11], under similar experimental conditions, we did not observe any increase nor decrease of FXN binding to the core complex (Fig S4A–B). Furthermore, high (100 $\mu$ M) or low (using bathophenanthroline Fe<sup>2+</sup> chelation) iron concentrations in reducing condition, or the presence of different metals (50  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) had no effect on the formation of the complex (Fig S4C–D).

Together, our results demonstrate that frataxin interacts with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 complex rather than with the individual components to form a stable quaternary complex.

#### A surface encompassing the acidic ridge and the b-sheets is involved in the interaction between frataxin and the core complex

To identify residues on frataxin that are essential for the interaction with the ISCU/NFS1/ISD11 complex, 13 recombi-

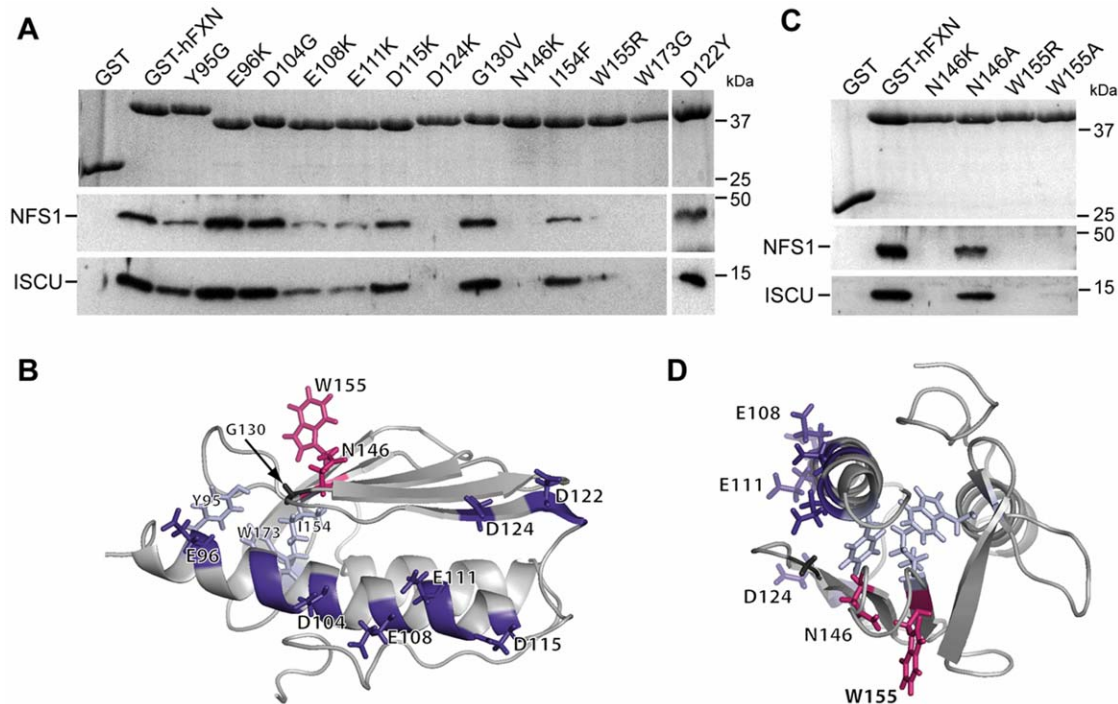
nant GST-tagged human mature FXN<sub>81–210</sub> carrying specific point mutations were tested by GST pull-down using mitochondrial HeLa cell extracts (Fig 3A–B). Again, only endogenous ISCU and NFS1 could be detected by western blot due to the inability of the NFS1 antibody to detect endogenous ISD11. Six of the mutational substitutions constructed are pathological mutations found in compound heterozygous FRDA patients (D122Y, G130V, N146K, I154F, W155R and W173G) [25]. Seven mutations were directed against acidic residues from the acidic ridge of frataxin (E96K, D104G, E108K, E111K, D115K, D122Y and D124K). One mutation, Y95G, was proposed to stabilize the trimeric structure in yeast frataxin [26]. All mutations involved residues exposed on the protein surface except Y95, I154 and W173, for which side chains are mostly buried in the protein core (Fig 3B). Therefore, the absence of interaction of the W173G recombinant protein and the reduced interactions of the Y95G and I154F recombinant proteins most likely reflect a structural role of these residues (Fig 3A). These results are consistent with several studies that have reported the effect of the W173G and I154F mutations on the stability of the human frataxin protein, both *in vitro* and *in vivo* [15,27–29]. While the E108K and E111K mutants enabled the interaction with the complex, although diminished, the D124K mutation caused a drastic decrease in the interaction with ISCU and NFS1 (Fig 3A). Mutations at the acidic



**Figure 2. Frataxin binds a pre-formed ISCU/NFS1/ISD11 complex.** (A) Co-purification of ISCU/NFS1/ISD11 with GST-mFXN. GST-mFXN or GST were co-expressed with mISCU, mNFS1/mISD11 or mISCU/mNFS1/mISD11 in bacteria (+ and – indicates the presence of each expressing vector). Fractions were analysed by SDS-PAGE and coomassie blue staining (upper panel) or by Western blot (IB). (B) GST-mFXN was co-expressed with mISCU, mNFS1 and mISD11 and purified as in (A). Samples were loaded on a 7.5% non-denaturing gel and stained with coomassie blue. Western blot analysis and mass spectrometry analysis confirmed that the upper band corresponds to a complex containing mFXN, mISCU, mNFS1 and mISD11. (C) Co-purification of NFS1/ISD11 with mISCU-HIS (left). mISCU-HIS was co-expressed with mNFS1 and mISD11 and purified by cobalt column. Co-purification of mISCU-HIS/mNFS1/mISD11 with GST-mFXN (right). GST pull down using GST or GST-mFXN with purified mISCU-HIS/mNFS1/mISD11 complex. The samples were loaded on a SDS-gel and analysed by Western blot using NFS1, ISD11 and ISCU specific antibodies. + and – indicate the presence and the absence of the corresponding vectors, respectively. (D) Native complex from HeLa cells. GST and GST-hFXN were incubated with mitochondrial HeLa extract, pull-down and loaded on non-denaturing gel. Only two protein complexes were detected by coomassie staining. Mass spectrometry analysis and western blot confirmed that one corresponds to GST-hFXN dimer and the second to the GST-hFXN/ISCU/NFS1/ISD11 complex. With the exception of the common contaminating proteins (keratins and elongation factor 1) found by mass spectrometry analysis, the only proteins present in the band corresponding to the quaternary complex were NFS1 (10 peptides, 28.2% coverage), hFXN (5 peptides, 18.6% coverage), ISCU (4 peptides, 24% coverage) and ISD11 (4 peptides, 29.7% coverage).  
doi:10.1371/journal.pone.0016199.g002

residues E96, D104, D115 and D122, as well as the pathological G130V mutation, associated with an atypical milder phenotype in FRDA, had no impact on the interaction (Fig 3A). In contrast, the W155R and the N146K mutations strongly affected the

interaction with NFS1 and ISCU (Fig 3A). Similarly, ISCU, NFS1 and ISD11 were not detected by mass spectrometry analysis (Table S1) or western blot in a FXN<sup>N146K</sup>-flag IP from HeLa mitochondrial extract, although MPPβ was detected (data not



**Figure 3. Residues in the  $\alpha$ 1-helix and the  $\beta$ -sheets of frataxin are crucial for the interaction with ISCU and NFS1.** (A) GST pull-down using different GST-hFXN mutants. GST-hFXN mutants were obtained by directed mutagenesis (only amino acid changes are indicated). GST pull-downs were carried out as in Fig 1C and analyzed by SDS-PAGE and coomassie blue staining to visualize GST-hFXN (upper panel), and by Western blot using antibodies against NFS1 and ISCU. (B) Solution structure of human frataxin (PDB ID 1LY7) showing the localization of the residues mutated. (C) GST pull-down using GST-hFXN mutants N146K, N146A, W155R and W155A. Experiments were carried out as in Fig 1C. (D) Top view of the solution structure shown in (B). The five residues affecting the interaction with the ISCU/NFS1/ISD11 complex define a potential interaction surface on frataxin.

doi:10.1371/journal.pone.0016199.g003

shown). Furthermore, no co-purification of mNFS1, mISCU and mISD11 could be observed using GST-hFXN<sup>N146K</sup> in a bacterial co-expression experiment (Fig S3C).

As the absence of interaction with the N146K and W155R mutants could be due to steric or electrostatic hindrance, two milder mutations were constructed, replacing N146 and W155 by alanines. The N146A mutation restored the interaction with the complex, while the W155A mutation did not (Fig 3C), indicating that the protruding tryptophan is an essential residue for interaction with the complex.

We have therefore identified three mutations directed against the residues from the acidic ridge of frataxin (E108K, E111K and D124K) and two surface-exposed mutations (W155R and N146K) that specifically disrupted the interaction of frataxin with the core complex, defining a surface of interaction on one side of frataxin, spreading from the acidic ridge to the  $\beta$ 4-sheet (Fig 3D).

### The association of frataxin with the *de novo* Fe-S cluster biosynthesis complex is crucial for cellular function

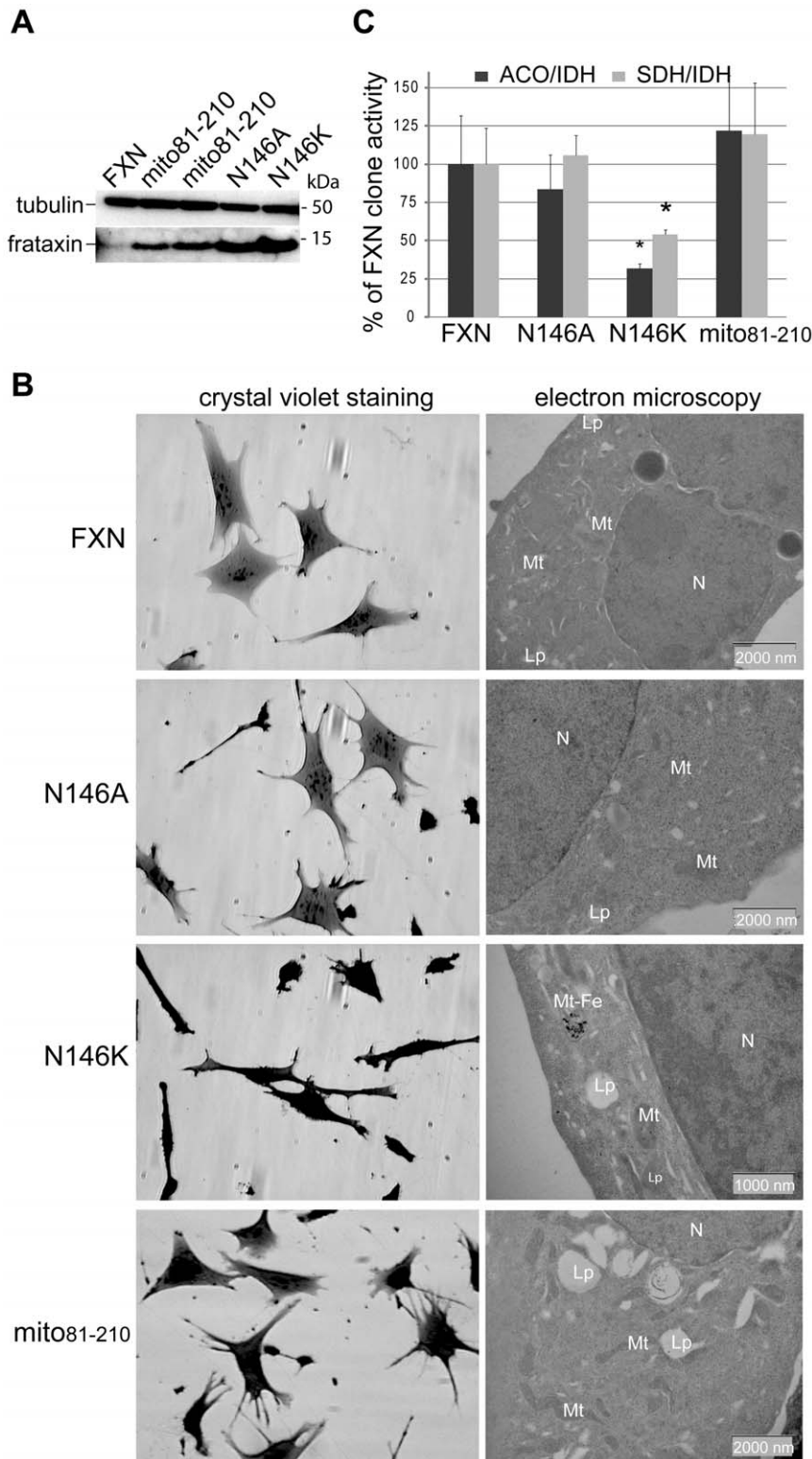
To determine whether the interaction between frataxin and the core complex is an essential function of frataxin *in vivo*, we generated four murine fibroblast cell lines stably expressing full length hFXN<sup>N146K</sup>, hFXN<sup>N146A</sup>, hFXN<sup>W155R</sup> or hFXN<sup>W155A</sup> in the conditional allele background enabling the deletion of the endogenous gene [30]. Complete frataxin deficiency in this fibroblast cell line does not sustain cell division and survival [30]. All mutant proteins were properly targeted to mitochondria and matured (Fig S5A). After endogenous frataxin deletion, while we isolated 12 clones carrying wild-type frataxin, 5 clones

expressing the hFXN<sup>N146A</sup>, and a single clone expressing the hFXN<sup>N146K</sup> (Fig 4A), no clone expressing either hFXN<sup>W155R</sup> or hFXN<sup>W155A</sup> was isolated (Fig S5B–C), further demonstrating that W155 is an essential residue for frataxin function. Wild-type and N146A clones did not present any gross phenotype (Fig 4B), nor sensitivity to oxidative stress (Fig S5C–D), a feature of frataxin haploinsufficiency [30]. In contrast, the N146K clone showed spindle-shaped and retracted cells with a strong growth defect, and displayed the classical features of FRDA (degenerating mitochondria, electron dense deposits, deficit in Fe-S enzyme activities) (Fig 4B–C and Fig S5E). Together, these results strongly suggest that interfering with the quaternary complex formation in the cell leads to a typical FRDA phenotype and that the interaction of frataxin with the core complex is the essential function of mammalian frataxin *in vivo*.

### The quaternary complex has a molecular mass of $\approx$ 190 kDa

Two different strategies were followed to purify the quaternary complex. Either a double GSH and nickel column purification or a single nickel column purification was carried out from GST-mFXN/mISCU/HIS-mNFS1/mISD11 or mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 expressing bacteria, respectively (Fig S6A). The complexes were further purified by gel filtration. Fractions containing the GST-mFXN/mISCU/HIS-mNFS1/mISD11 complex (fractions 14 to 18 corresponding to  $\approx$ 4 mg of complex, Fig. S6B) or the mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 (fractions 19 and 20 corresponding to  $\approx$ 3 mg of complex, Fig. 5A) were concentrated for native ESI mass spectrometry analysis. Multi-





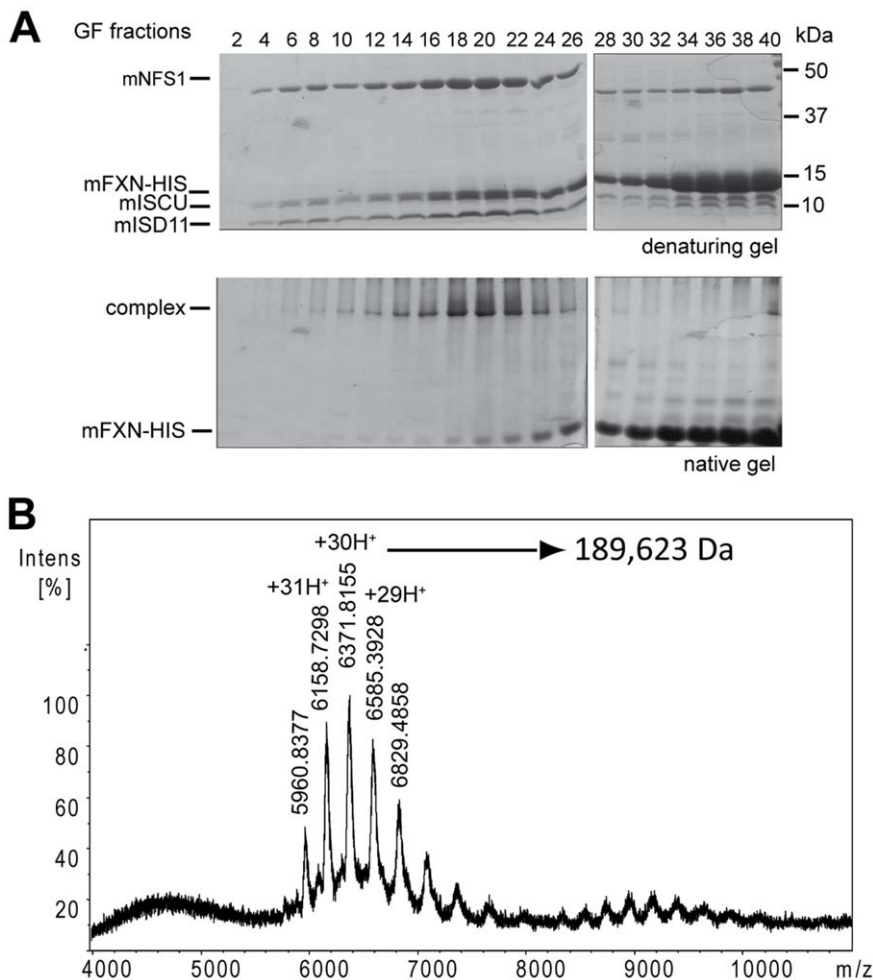
**Figure 4. The interaction between frataxin and the Iscu/Nfs1/Isc11 complex is essential for cellular function.** (A) Western blot analysis of mitochondria-enriched fractions from clones expressing wild type frataxin, mito81-210, FXN<sup>N146A</sup> and FXN<sup>N146K</sup> using anti-frataxin and anti-tubulin antibodies. (B) Morphological and ultrastructural alterations in FXN, N146A, N146K and mito81-210 clones. Each clone was studied by phase contrast microscopy after crystal violet staining (left panels) and electron microscopy analysis (right panels). mt, mitochondria; Lp, lipid droplet; mt-Fe, intramitochondrial iron deposits; N, nucleus. (C) Biochemical measurements of Fe-S enzyme activities in FXN, N146A, N146K and mito81-210 clones. Succinate dehydrogenase (grey bars) and aconitases (dark grey bars) specific activities were standardized to isocitrate dehydrogenase (IDH) specific activity and expressed as percentage of control activity. Results were obtained from two independent experiments using 4 FXN, 3 N146A, 1 N146K and 4 mito81-210 clones. Data are represented as mean + SD. \* p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0016199.g004

charged ions were detected for both complexes, even at high potential (250 kV) (Fig 5B and Fig S6C). Molecular weights of 237,130 Da and 189,623 Da were deduced for the GST-mFXN/mISCU/HIS-mNFS1/mISD11 and mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 complexes, respectively. The difference between the masses of the two complexes is suggestive of two frataxins per complex, considering the difference in mass between GST-mFXN and mFXN-HIS (Fig S6D). Furthermore, using a concentration curve of purified proteins, the mISCU:mFXN ratio per complex was estimated to be one (Fig S6E). Such calculation could however not be achieved for mNFS1 or mISD11, as neither protein is stable when expressed alone. Although the ternary complex can be isolated by gel filtration (Fig S7A), the yield is very low due to instability of the complex upon concentration. As for the bacterial IscU/IscS complex [19], the ternary complex can be stabilized by the insertion of the D72A mutation on mISCU (Fig S7B). However, this stabilization is not sufficient to allow concentration for ESI mass spectrometry analysis. Therefore, assuming mNFS1 as a dimer, the observed mass is suggestive of stoichiometric amount of mNFS1, mFXN and mISCU. Interest-

ingly, the mass is compatible with the presence of 3 or 4 mISD11 per complex (Fig. S6D).

### The mitochondrial hFXN<sub>81-210</sub> form of frataxin is the essential functional form *in vivo*

Mature hFXN<sub>81-210</sub> is the main endogenous form of frataxin in human tissues and cell lines [24]. However, during the maturation process, a longer intermediate form (hFXN<sub>42-210</sub>) is expressed. This intermediate form, as well as a longer hFXN<sub>56-210</sub> form can interact with the core complex (Fig S1B). To determine whether hFXN<sub>81-210</sub> is the essential functional form of frataxin *in vivo*, we expressed a recombinant protein (mito<sub>81-210</sub>) with its own mitochondrial targeting sequence (aa 1–41) fused directly to the sequence of mature frataxin (aa 81–210), bypassing the intermediate hFXN<sub>42-210</sub> form. Interestingly, when expressed in Cos-1 cells, although mito<sub>81-210</sub> was correctly processed, the level of mature frataxin was decreased, and the precursor form accumulated within the cytosol (Fig S5F), suggesting that amino acids 42–80 of human frataxin are partially involved in the mitochondrial targeting. In murine fibroblasts, mito<sub>81-210</sub> was able to completely



**Figure 5. Determination of the molecular weight of the FXN/ISCU/NFS1/ISD11 complex.** (A) Gel filtration for the mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 complex. After a single nickel column purification, the sample was loaded and separated by gel filtration. Coomassie staining of a denaturing and a non-denaturing gel corresponding to fractions 2 to 40 are shown. Fractions 19 and 20 that contained the complex were concentrated for the native mass spectrometry analysis. (B) ESI native mass spectra of the mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 complex after gel filtration purification. The experimental molecular weight for each component was 10,722 Da, 14,543 Da, 15,333 Da and 44,669 Da for mISD11, mISCU, mFXN-HIS and mNFS1, respectively. The mass was estimated to the molecular weights of 189,623 Da. doi:10.1371/journal.pone.0016199.g005

rescue the cell lethality induced by endogenous frataxin deletion, whereas a cytosolic version of hFXN<sub>81–210</sub> was unable (Fig 4 and Fig S5B–C). The clones expressing mito<sub>81–210</sub> showed no morphological or structural abnormalities (Fig 4B), normal Fe-S enzyme activities (Fig 4C), and no susceptibility to exogenous oxidative stress (Fig S5D). These results demonstrate that mito<sub>81–210</sub> is sufficient to complement endogenous frataxin functions and promote survival, providing the evidence that mature hFXN<sub>81–210</sub> is the functional form for *in vivo* Fe-S cluster biosynthesis.

## Discussion

Frataxin has been proposed to be a multifunctional protein based on its numerous interactions, including components of the Fe-S biosynthesis machinery, ferroxidase, mitochondrial aconitase, succinate dehydrogenase, and several chaperones [2,9–12,15]. In the present study, the only endogenous proteins that co-purified with a recombinantly expressed frataxin are ISCU, NFS1, ISD11 and MPP $\beta$ , suggesting that these proteins stably associate with frataxin, and belong thus to the core network of frataxin partners *in vivo*. Furthermore, we showed that *in vivo* expression of frataxin mutants that affect the interaction with the core components of *de novo* Fe-S cluster biosynthesis triggers cell death (W155R and W155A) or a classical FRDA phenotype (N146K), while frataxin mutants that keep the ability to interact lead to normal cellular phenotype (N146A). Altogether, our results strongly suggest that the interaction of frataxin with the Fe-S cluster assembly complex defines the essential function of frataxin *in vivo*. Although the relevance of the other reported interactions needs to be further investigated *in vivo*, we cannot exclude that less stable or transient interactions with frataxin could not be detected in our experimental conditions. Furthermore, we show that mitochondrial mature frataxin (hFXN<sub>81–210</sub>) was sufficient to support cell survival with a normal phenotype (Fig 4).

Each of the individual components of the *de novo* Fe-S biosynthesis complex (Isu/Iscu, IscS and Isd11) has been proposed to be the molecular adaptor for frataxin interaction [6,11,12,14,15,22]. However, in the heterologous expression system, our results demonstrate that mammalian frataxin interacts with the preformed ISCU/NFS1/ISD11 complex rather than with the individual proteins. The interaction of frataxin in complex with both the Fe-S scaffold and the cysteine desulfurase is most likely conserved throughout evolution, as demonstrated by the co-purification of Isu/Nfs1 with Yfh1 in yeast [11] and IscU/IscS with CyaY in bacteria [12]. However, in contrast to our results with the mammalian protein, in yeast, a N122K mutation on Yfh1 (equivalent to the human N146K) had more effect on the interaction with Isu1 than with Nfs1/Ids11 [16], indicating that this residue is most likely involved in the interaction with the scaffold protein. In addition, mutations on positively charged residues of IscS were recently reported to affect specifically the interaction of IscS with CyaY [31]. Similarly, mutations on positively charged residues of Nfs1 perturbed the complex formation in the mammalian system (Fig S3D). Together with our results, these data strongly suggest that NFS1 and ISCU define the interaction surface that is targeted by frataxin. Based on the mutational screen results and the published literature [13,15,16,22,31], we propose that part of the acidic ridge of frataxin could be involved in the interaction with conserved basic residues of NFS1, while residues on the  $\beta$ -sheets (including W155) would be crucial for the interaction with ISCU. Although  $\pi$  interactions between the W155 and R165 residues contribute to frataxin stability [28], it is unlikely that a fold defect of the W155A mutant underlies the loss of interaction with the complex, as the protein was properly expressed and matured *in*

*in vivo*, and was not degraded by the mitochondrial quality control protease machinery. Furthermore, in Yfh1, a R141A mutation which should elicit the loss of the  $\pi$  interactions between W131 and R141, had no effect on the interaction with Isu1 [13]. Finally, the crystal structure of the bacterial IscS/IscU complex demonstrated one IscU monomer per active site of IscS, which are located on opposite sides of the IscS homodimer [31]. Based on the stoichiometry and the mutagenesis experiments, it is reasonable to hypothesize that there is one FXN monomer and one ISCU monomer per active site of NFS1. Furthermore, the mass spectrometry data suggest that there are 3–4 ISD11 on the complex. While the exact role of the eukaryotic ISD11 is not known, it is clearly essential for both the quaternary and ternary complexes formation (Fig 2A). Whether frataxin and ISD11 have direct interacting surfaces still needs to be determined.

It has recently been suggested that iron oxidation-driven oligomerization of yeast frataxin promotes the assembly of a stable core Fe-S complex [14]. Our data clearly demonstrate that the mature hFXN<sub>81–210</sub> is the essential form of frataxin *in vivo*. While we have not directly tested the capacity of hFXN<sub>81–210</sub> to oligomerise, it has recently been reported that hFXN<sub>81–210</sub> is not prone to iron-induced oligomerisation [32], in contrast to yeast or bacterial frataxin or longer forms of human frataxin. Furthermore, our native gel analyses as well as our gel filtration and stoichiometric data are incompatible with an oligomeric form of frataxin as the functional unit in the purified quaternary complex. Finally, it is worth noting that the sites of interaction with the complex that we have identified on frataxin are buried within the oligomeric structure [26]. Together, these results are not supportive of an oligomeric form of frataxin as the essential functional unit *in vivo* for Fe-S cluster biosynthesis, but rather suggest that mature frataxin is monomeric.

Frataxin has been proposed to be either the iron donor for Fe-S cluster biosynthesis or a regulatory protein that inhibits Fe-S cluster formation [11,22]. Although we cannot conclude on the role of frataxin as the iron donor for Fe-S cluster assembly, our experiments indicate that the iron concentration does not modulate the interaction between mammalian frataxin and the ternary complex. While the reason for this observed difference with the yeast remains to be determined, it might arise from the relatively different iron-binding properties of mammalian frataxin in comparison to yeast frataxin [3]. Furthermore, *in vivo* frataxin deficiency [33,34,35] as well as the expression of the N146K mutant (Fig 4C) lead to a strong decrease of Fe-S cluster biosynthesis rather than a complete deficit. These data demonstrate that frataxin is required but not essential for proper Fe-S cluster biosynthesis, and suggest that frataxin might facilitate efficient Fe-S cluster biosynthesis *in vivo*. In bacteria, cluster assembly has been demonstrated to be a dynamic process that involves the dissociation of IscU and IscS for cluster transfer [19]. By interacting with a preformed ISCU/NFS1/ISD11, FXN probably prevents the dissociation of NFS1/ISD11 and ISCU, having the effect of increasing the stability of the ISCU/NFS1/ISD11 interaction. To quantitatively demonstrate the effect of frataxin on the stability of the ternary complex, the affinities of ISCU for NFS1/ISD11 in the absence and the presence of frataxin should be measured. However, the current technical difficulties to purify large quantities of the mammalian NFS1/ISD11 complex prevent such an approach. Assuming that, as mammalian frataxin, CyaY preferentially interacts with the preformed IscU/IscS complex, the addition of frataxin in reconstitution experiments would lead to uncompetitive inhibition, thus explaining the reported inhibitory effect of CyaY on Fe-S cluster formation *in vitro* [22].

In conclusion, the properties of the interaction of frataxin with the core complex in the heterologous system open new perspectives on how frataxin might facilitate Fe-S cluster biogenesis *in vivo*. While in the absence of frataxin, the interaction between ISCU and NFS1/ISD11 is unstable and very dynamic [19], frataxin might function by maintaining the ISCU/NFS1/ISD11 interaction. Interestingly, a recent crystal structure of the bacterial IscS/IscU heterotetramer demonstrated that the catalytic cysteine of IscS and the acceptor cysteines on IscU are too far in distance to allow direct transfer, suggesting that a conformational rearrangement is necessary to bring together the sulfur donor and the acceptor cysteines [31]. It is tempting to speculate that frataxin interaction with the complex triggers this conformational rearrangement to allow efficient sulfur and iron transfer. By analogy to *Thermus Thermophilus* Nqo15, the frataxin-like subunit present in the hydrophilic domain of the respiratory chain complex I [36], one possibility would be that frataxin creates a channel on the interface with the complex allowing a more efficient iron delivery into the site of cluster synthesis. It has recently been proposed, based on biochemical and biophysical data, that the Isu1-interacting surface of yeast frataxin encompasses the iron binding sites, thereby positioning frataxin for iron delivery to Isu1 close to the Fe-S cluster assembly site [37]. The authors suggest a model in which frataxin would dissociate from the complex following iron delivery, prompting Isu1 to complete Fe-S cluster assembly [37]. On the other hand, a stabilised complex might be necessary to provide a safe environment for Fe-S cluster formation or to allow all the consecutive reaction steps to occur. Further challenging biochemical and spectroscopic studies are necessary to characterize the role of frataxin within the quaternary complex, as well as the sequence of events of the early steps of *de novo* Fe-S cluster biogenesis.

While our manuscript was under review, two groups independently reported biochemical results that nicely complement our work [38,39]. Similarly to our results, Tsai *et al.* provided *in vitro* evidence that human frataxin binds, in an iron independent manner, to a NFS1, ISCU and ISD11 complex to generate the quaternary complex [38]. Very interestingly, they demonstrated that frataxin stimulates the cysteine desulfurase activity. As the cysteine desulfurase activity could be further stimulated by the addition of Fe<sup>2+</sup>, the authors proposed that frataxin functions with Fe<sup>2+</sup> as an allosteric activator for Fe-S cluster assembly. In the second manuscript, by combining small-angle X-ray scattering (SAXS) and NMR studies with mutagenesis studies on the bacterial homologs, Prisci *et al.* have defined an interaction surface between CyaY, IscS and IscU that is consistent with the interaction surface that we have proposed [39]. Furthermore, through biolayer interferometry, they demonstrated that CyaY enhances the affinity of IscU on IscS, thereby stabilizing the complex, providing the biophysical evidence for the inhibitory effect of CyaY on IscS/IscU enzymatic kinetics. In the future, it will be extremely interesting to further compare the biophysical characteristics of the complexes from different organisms and to determine the effect of the pathological FRDA mutations on the cysteine desulfurase activity and Fe-S cluster assembly.

## Materials and Methods

### Recombinant protein purification

The technical procedures involved in plasmid and strain constructions are described in Material and Methods S1. For low scale GST purifications, the suspension was centrifuged 15,000 g, 4°C for 15–30 min and the supernatant was incubated with glutathione-S-sepharose beads (Pharmacia) for 3 hours at 4°C. The mix was loaded on chromatography column (BIORAD)

and washed with PBS. Elution was performed with 35mM glutathione in Tris-HCl 100mM, pH 8, NaCl 150mM for 10 min at 4°C. Elutions were dialysed 2–3 hours in PBS, 5mM EDTA, 5mM DTT at 4°C using dialysis column (ThermoScientific). For large-scale purification, the suspension was centrifuged 40,000 rpm (Ti50.2, Beckman), 4°C, 30 min and the supernatant was further purified by FPLC (AKTA, GE Healthcare). The supernatant was loaded on Cobalt or Nickel affinity column (GE Healthcare) or glutathione sepharose affinity column (GE Healthcare). After wash with PBS, elution was carried out using 200mM imidazole or 35mM glutathione. Gel filtration (GF) was carried out on Superdex S200 (16/90) or (10/30) (Amersham Biosciences) columns. For native mass spectrometry analysis, elution was performed with 50mM ammonium acetate. Samples were concentrated using Vivaspinn columns (c.o. 100,000, Sartorius). Protein concentrations were determined by Bradford assay.

### GST pull-down assays

GST pull-downs were performed by incubating 100µg of GST-fused protein with 5–10mg mitochondria enriched extracts and glutathione-S sepharose beads for 3 hours in Tris-HCl 100mM, pH 7.5, 10% glycerol, 100mM KCl and Complete protease inhibitor cocktail (Roche). The mix was loaded on a chromatography column (BIORAD), washed with PBS, 100mM KCl. Elution was performed in loading buffer after boiling for 10 min. To test the effect of metals on the interactions, 50µM or 100µM FeSO<sub>4</sub> with 500µM–10mM ascorbic acid or 50 µM of either NiSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> were added during extraction and wash steps. Iron chelators (EDTA or bathophenanthroline disulfonic acid) 1mM were added in some samples during wash or incubation steps, as indicated in figure legends.

### Cell culture and protein extraction

HeLa cells (ATCC-USA) were grown and transfected as previously described [24]. Cells were harvested 24 hours after transfection. Culture, stable transfection, and clonal selection of immortalized mouse fibroblasts established from *Fdda*<sup>L3/L-</sup> mice were carried out as described [30]. Total, mitochondrial-enriched and cytosolic fractions were obtained as described [24].

### Biochemical assays

Enzymatic activities, crystal violet staining, electron microscopy and determination of the sensitivity to stress were performed as previously described [30].

### Immunoprecipitation

FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated by incubating overnight 100–200µL FLAG M2 coupled resin (SIGMA) (prepared as recommended by the manufacturer) with 500µg to 1.5mg of mitochondria enriched extract in Tris-HCl 100mM, pH 7.5, 10% glycerol, 100mM KCl and Complete protease inhibitor cocktail (Roche). The mix was loaded on a chromatography column (BIORAD), washed 4 times with 5 mL PBS, 100mM KCl. Elution was performed by resuspending the beads in loading buffer and boiling for 10 min or by incubating beads with glycine 0.1 M pH 3 for 10 min. IP of endogenous mitochondrial aconitase was performed as described [10].

### PAGE and Western blot analysis

14% acrylamide SDS-Glycine-PAGE was used unless otherwise indicated. 7.5% or 10% acrylamide native gels were prepared without reductant. Western blot were carried out as previously

described [24]. Antibodies were diluted as indicated in Material and Methods S1. Silver staining was performed as described [24]. Quantification of coomassie blue staining was performed on a Chemigenius<sup>2</sup> (SYNGENE).

### Mass spectrometry analysis

IP were loaded on 4–12% NuPAGE<sup>®</sup> gel (INVITROGEN). Ten bands from 5 kDa to 130 kDa were cut and prepared for MS analysis using trypsin for the protein digestion. Samples were analysed by NanoLC-nanoESI/MS<sup>2</sup>. Native mass determination was carried out by ESI-MS analysis. Further details are given in Material and Methods S1.

### Statistics

All data represent mean  $\pm$  SD. The statistical analysis was performed by standard Student T-test. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

### Supporting Information

**Figure S1 Conserved domain of frataxin is involved in the interaction with ISCU and NFS1.** (A) The monoclonal 1G2 antibody directed against exon 3–4 of frataxin prevented the interaction between frataxin and ISCU and NFS1. GST pull-down was performed as described in Fig. 1C with the addition (+) or not (–) of 1G2 antibody. Note that the 1G2 antibody is retained by GST-hFXN (heavy and light chain) and prevents interaction with ISCU and NFS1. (B) GST-hFXN pull-down was performed on mitochondrial HeLa extract as in Fig. 1C using different GST-hFXN constructs. As the capacity of GST-hFXN<sub>42–210</sub>, GST-hFXN<sub>56–210</sub> and GST-hFXN<sub>81–210</sub> to interact with NFS1 and ISCU were equivalent, we perform all following GST pull-down with the GST-hFXN<sub>81–210</sub> expressing construct that corresponds to the size of the endogenous mature human frataxin. (JPG)

**Figure S2 Absence of interaction between frataxin and mitochondrial aconitase.** (A) Immunoprecipitation of mitochondrial aconitase from HeLa mitochondrial extracts was performed exactly as described (1), with the same anti-aconitase antibody kindly provided by Anne-Laure Bulteau. Mitochondria were treated with 100  $\mu$ M hydrogen peroxide and 2 mM of citrate (+) prior to the IP. Samples were loaded on SDS-PAGE and analysed by Western blot using specific antibodies against frataxin and mitochondrial aconitase. (B) Immunoprecipitation of hFXN-FLAG was performed as in Fig. 1A. Mitochondria were treated or not with hydrogen peroxide and citrate as in (A). Samples were analysed by Western blot. (JPG)

**Figure S3 Frataxin interaction with ISCU/NFS1/ISD11 complex and effects of mutations.** (A) Expression of mNFS1, mISCU and mISD11 in bacteria co-transformed with different sets of vectors. Soluble fractions of bacteria expressing GST-FXN, mNFS1, mISD11 and/or mISCU were loaded on a SDS-gel and analysed by Western blot using NFS1, ISD11 and ISCU specific antibodies. + and – indicate the presence and the absence of the corresponding vectors, respectively. (B) GST pull-down using a limiting amount of GST-FXN and a bacterial extract expressing mISCU/mNFS1/mISD11. 25mg of GST or GST-FXN were added to the bacterial lysate before purification on glutathione-sepharose beads. The elutions were analyzed on SDS-PAGE by silver staining. (C) Co-purification of ISCU/NFS1/ISD11 with

GST-hFXN<sup>N146K</sup>. GST-hFXN or GST-hFXN<sup>N146K</sup> (N146K) were co-expressed with mISCU, mNFS1 and mISD11 and purified on glutathione-S-sepharose column as in Fig. 2A. Elutions were analysed by SDS-PAGE and coomassie blue staining (upper panel) or Western blot (IB). (D) Mutations of positively charged residues on NFS1 affect frataxin interaction with the complex. R220D and R225D mutations were introduced by directed mutagenesis on mNFS1 cDNA. Co-purification was carried out as in Fig. 2A and analyzed on native and denaturing gel by coomassie blue staining. Western blot on mNFS1 was performed to verify the correct expression of the two mNFS1 mutants. (JPG)

**Figure S4 Absence of effect of different metals on complex formation.** (A) Effect of iron on the interaction of frataxin with ISCU and NFS1. GST pull-down was carried out as in Fig. 1C with the exception that the extraction, purification and wash steps were carried out in the absence or the presence of 100 mM FeSO<sub>4</sub>/1 mM ascorbate (Fe<sup>2+</sup>) and 1 mM EDTA as indicated. (B) Effect of iron on native GST-mFXN/ISCU/NFS1/ISD11 complex. GST-mFXN was co-expressed with mISCU, mNFS1 and mISD11 and purified as in Fig. 2A. Iron or EDTA was added during extraction and wash steps. Samples were loaded on a 7.5% non-denaturing gel and stained with coomassie blue. Western blot analysis and mass spectrometry analysis confirmed that the upper band corresponds to a complex containing mFXN, mISCU, mNFS1 and mISD11. (C) Effect of iron on the complex formation. A bacterial soluble extract containing mNFS1, mISCU and mISD11 was incubated with 0.1mM ferrous iron sulfate or 1 mM bathophenanthroline disulfonic acid (BP) in the presence of 10mM ascorbic acid (reducing condition) as indicated. Efficient Fe<sup>2+</sup> chelation by BP was observed as the solution turned red, accounting for the BP-Fe<sup>2+</sup> complex formation. Purified GST or GST-mFXN was then added to each sample and further incubated to allow GST-mFXN/ISCU/NFS1/ISD11 complex formation. The samples were analysed by native PAGE and coomassie blue staining and by western blot using a frataxin antibody (IB). The ratio between frataxin as a monomer and frataxin in the complex was not modified by iron excess or depletion, indicating that the complex formation is not iron-dependent. (D) Effect of different metals on the complex formation. A bacterial soluble extract containing mNFS1, mISCU and mISD11 was incubated with 0.05mM nickel sulfate, zinc chloride, calcium chloride or magnesium sulfate as indicated. Purified GST or GST-mFXN was then added to each sample and further incubated to allow GST-mFXN/ISCU/NFS1/ISD11 complex formation followed by a GST tag purification. The samples were then analysed by native and denaturing PAGE and coomassie blue staining. (JPG)

**Figure S5 Characterization of fibroblast cell clones carrying wild type or mutant FXN.** (A) Transient transfection of wild-type FXN or mutants N146A, N146K, W155R and W155A in COS-1 cells. Total extracts were loaded on a SDS-gel and analyzed by Western blot using anti-frataxin and anti-tubulin antibodies. For each construct, signals for precursor, intermediate and mature frataxin are equivalent suggesting that the mutations do not disturb the expression and the maturation process of the protein. NT corresponds to non-transfected COS-1 cells. (B) Genotyping on heterozygous L3/L– cell populations expressing either wild type or mutant (N146A, N146K or mito81–210) hFXN before (L3/L–) and after pEGFP-Cre transfection and clonal

sorting. One clone is presented for each construct. (C) Summary of the number of clones obtained for each frataxin mutant and the corresponding cellular and biochemical phenotypes observed. (D) Determination of oxidative stress sensitivity of wild-type FXN and mutants N146A and mito81–210 clones. Cells were incubated with DHR123 and analyzed by FACS. The thin curves represent the autofluorescence of cells without DHR123 treatment. The black curves represent the fluorescence observed with no exogenous stress, and the grey curves represent the fluorescence induced after hydrogen peroxide treatment (20  $\mu$ M; 30 min). Experiments were done in duplicate on 4 clones of FXN, 3 clones of N146A and 4 clones of mito81–210. I154F mutant clone was used as a positive control. (E) Ultrastructural alterations in the N146K clone observed by electron microscopy analysis. mt, mitochondria; Lp, lipid droplet; mt-Fe, intramitochondrial iron deposits; N, nucleus. (F) Transient transfection of wild-type hFXN or mito81–210 in COS-1 cells. Total extracts (left panel) were loaded on a SDS-gel and analyzed by Western blot using anti-frataxin antibody. NT corresponds to non-transfected COS-1 cells. On the right panel, cellular fractionation of COS-1 cells transfected with mito81–210. Cytosolic and mitochondrial fractions were loaded on gel and analyzed using anti-frataxin antibody by Western blot.

(JPG)

**Figure S6 Purification and characterisation of the FXN/NFS1/ISCU/ISD11 complex.** (A) GST-mFXN was co-expressed with mISCU, HIS-mNFS1 and mISD11 followed by double purification using GSH and nickel columns. The presence of the HIS tag on NFS1 had no effect on complex formation (first and second lanes). The lane on the right shows the complex obtained after co-expression, and purification using the HIS tag of FXN-HIS with mISCU, mNFS1 and mISD11 on a native gel. (B) Gel filtration with the GST-mFXN/ISCU/HIS-NFS1/ISD11 complex. After purification using GSH and Nickel columns, the sample was loaded and separated by gel filtration. Sixty fractions were collected and fractions 2 to 40 were run on SDS- and native-PAGE to determine the protein composition by coomassie blue staining. Fractions 14 to 18 that contained the complex were concentrated for the native mass spectrometry analysis. Note that the signal observed for GST-mFXN after the double purification is due to contamination on the nickel column due to the large excess of GST-mFXN monomer present in the sample before gel filtration. (C) ESI native mass spectrum of the complex with GST-mFXN. The complex was purified as in indicated in (A) and (B) and submitted to native mass spectrometry analysis. The experimental molecular weight for each component obtained in denaturing conditions were 10,722 Da, 14,576 Da, 41,047 Da and 45,553 Da for mISD11, mISCU, GST-mFXN and HIS-mNFS1, respectively. A significant set of peaks (corresponding to the multicharged ions) was detected corresponding to a molecular weight of 237,130 Da. (D) Stoichiometry of the quaternary complex. Comparison of the molecular weight (MW) obtained with different combinations using the observed mass of each component and the observed mass of the complexes. NFS1 was considered as a dimer, by analogy with the bacterial IscS and NifS. The observed mass difference between the GST-mFXN/

mISCU/HIS-mNFS1/mISD11 complex and the mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 complex indicates that there are 2 frataxins per complex. The ISCU:frataxin ratio is 1 as measured in (F). The residual mass can be attributed to the presence of 3 or 4 ISD11 per complex. (E) Determination of the ISCU:frataxin ratio within the complex. mISCU-HIS and mFXN-HIS were purified by tag purification and gel filtration (S75). mISCU-HIS and mFXN-HIS fractions were quantified using the theoretical extinction coefficient at 280 nm of  $9,970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and  $26,930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectively (<http://expasy.org/tools/prot-param.html>). Both fractions were then used to generate standard curves. mFXN-HIS/mISCU/mNFS1/mISD11 complex was purified by coupling affinity tag purification and gel filtration (S200) and loaded on a SDS gel. The quantity of frataxin and mISCU was determined by densitometry after coomassie blue staining, using a Chemi genius<sup>2</sup> bio imaging system and GeneTools software (Syngene). The result is presented as the average obtained from six independent experiments  $\pm$  SD. Note that on the rare occasions when frataxin was less expressed, the quantity of frataxin per complex was lower.

(JPG)

**Figure S7 Purification of the mISCU/mNFS1/mISD11 ternary complex.** (A) The mISCU-HIS/mNFS1/mISD11 complex was purified from co-expressing bacteria using HIS-tag purification and gel filtration. Both the eluate (E) after HIS-tag purification (left panel) and the fractions of the gel filtration (right panel) were loaded on SDS-PAGE and analyzed by coomassie blue staining. The ternary complex was isolated in fractions 5 to 7. (B) The mISCUD72A-HIS/mNFS1/mISD11 complex was purified as in (A). The eluate (E) from the HIS-tag purification (left panel) and the fractions of the gel filtration (right panel) were loaded on SDS-PAGE and analyzed by coomassie blue staining. More ternary complex could be obtained compared to wild type mISCU (see (A)) in fractions 5 to 7, indicating that the D72A mutation increases the affinity of mISCU for mNFS1/mISD11.

(JPG)

**Materials and Methods S1**  
(DOC)

**Table S1**  
(XLS)

## Acknowledgments

We thank F. Ruffenach, C. Ebel, F. Legueux, N. Messaddeq, L. Beilschmidt for technical help, C. Bouton for NFS1 and ISD11 antibodies, D. Busso for original bacterial expression vectors, and A.L. Bulteau for immunoprecipitating aconitase antibody. We thank F. Klein for help for complex purification and discussion and B. Reina for helpful discussion.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS AM FC HP. Performed the experiments: SS AM FC AP MWD LR. Analyzed the data: SS AM FC AP HP. Wrote the paper: SS AM HP.

## References

- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271: 1423–1427.
- Schmucker S, Puccio H (2010) Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet* 19: R103–110.
- Pandolfo M, Pastore A (2009) The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol* 256 Suppl 1: 9–17.
- Cook JD, Bencze KZ, Jankovic AD, Crater AK, Busch CN, et al. (2006) Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* 45: 7767–7777.

5. Nair M, Adinolfi S, Pastore C, Kelly G, Temussi P, et al. (2004) Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* 12: 2037–2048.
6. Yoon T, Cowan JA (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* 125: 6078–6084.
7. Yoon T, Cowan JA (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferredoxinase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 279: 25943–25946.
8. O'Neill HA, Gakh O, Park S, Cui J, Mooney SM, et al. (2005) Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* 44: 537–545.
9. He Y, Alam SL, Proteasa SV, Zhang Y, Lesuisse E, et al. (2004) Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferredoxinase interaction. *Biochemistry* 43: 16254–16262.
10. Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, et al. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305: 242–245.
11. Gerber J, Muhlenhoff U, Lill R (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4: 906–911.
12. Layer G, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Fontecave M (2006) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J Biol Chem* 281: 16236–16263.
13. Leidgens S, De Smet S, Foury F (2010) Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its beta-sheet. *Hum Mol Genet* 19: 276–286.
14. Li H, Gakh O, Smith DYt, Isaya G (2009) Oligomeric yeast frataxin drives assembly of core machinery for mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 284: 21971–21980.
15. Shan Y, Napoli E, Cortopassi G (2007) Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet* 16: 929–941.
16. Wang T, Craig EA (2008) Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *J Biol Chem* 283: 12674–12679.
17. Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460: 831–838.
18. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74: 247–281.
19. Raulfs EC, O'Carroll IP, Dos Santos PC, Unciuleac MC, Dean DR (2008) In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8591–8596.
20. Adam AC, Bornhovd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K (2006) The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *Embo J* 25: 174–183.
21. Wiedemann N, Urzica E, Guiard B, Muller H, Lohaus C, et al. (2006) Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo J* 25: 184–195.
22. Adinolfi S, Iannuzzi C, Prischi F, Pastore C, Iametti S, et al. (2009) Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat Struct Mol Biol* 16: 390–396.
23. Koutnikova H, Campuzano V, Koenig M (1998) Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum Mol Genet* 7: 1485–1489.
24. Schmucker S, Argentini M, Carelle-Calmels N, Martelli A, Puccio H (2008) The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet* 17: 3521–3531.
25. Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, Minerì R, Seveso V, et al. (2007) Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* 8: 289–299.
26. Karlberg T, Schagerlof U, Gakh O, Park S, Ryde U, et al. (2006) The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* 14: 1535–1546.
27. Cavadini P, Gellera C, Patel PI, Isaya G (2000) Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 9: 2523–2530.
28. Correia AR, Adinolfi S, Pastore A, Gomes CM (2006) Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *Biochem J* 398: 605–611.
29. Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, Bradley JL, Crilley JG, et al. (2005) Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch Neurol* 62: 621–626.
30. Calmels N, Schmucker S, Wattenhofer-Donze M, Martelli A, Vaucamps N, et al. (2009) The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS One* 4: e6379.
31. Shi R, Proteau A, Villarroya M, Moukadiri I, Zhang L, et al. (2010) Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol* 8: e1000354.
32. Prischi F, Gianini C, Adinolfi S, Pastore A (2009) The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *FEBS J* 276: 6669–6676.
33. Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J, Lutz T (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11: 2635–2643.
34. Puccio H (2009) Multicellular models of Friedreich ataxia. *J Neurol* 256 Suppl 1: 18–24.
35. Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, et al. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27: 181–186.
36. Berrisford JM, Sazanov LA (2009) Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *J Biol Chem* 284: 29773–29783.
37. Cook JD, Kondapalli KC, Rawat S, Childs WC, Murugesan Y, et al. (2010) Molecular Details of the Yeast Frataxin-Isu1 Interaction during Mitochondrial Fe-S Cluster Assembly. *Biochemistry* 49: 8756–8765.
38. Tsai CL, Barondeau DP (2010) Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 49: 9132–9139.
39. Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, Pastore C, Adinolfi S, et al. (2010) Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 1: 95.

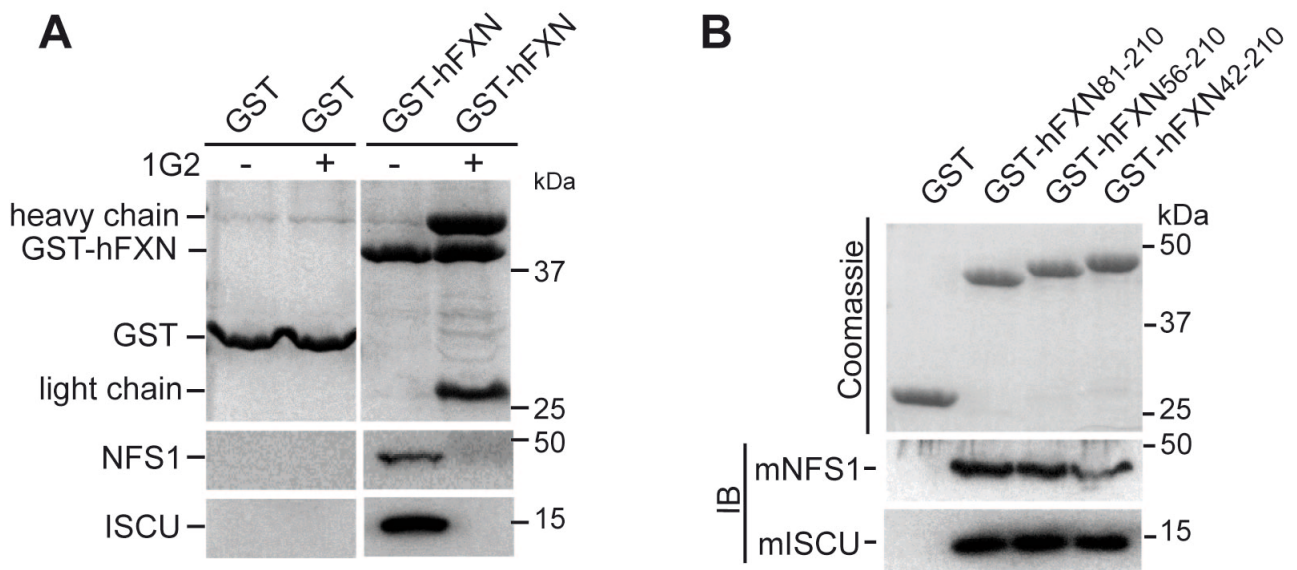


Figure S1 : Conserved domain of frataxin is involved in the interaction with ISCU and NFS1.

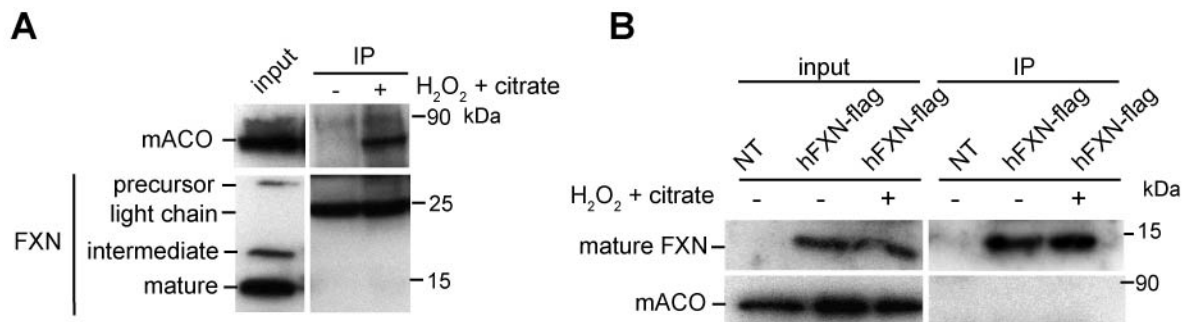


Figure S2 : Absence of interaction between frataxin and mitochondrial aconitase



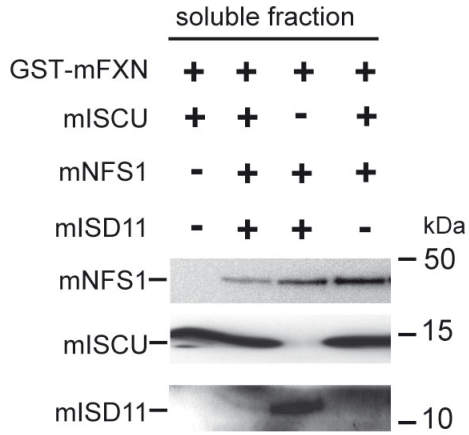
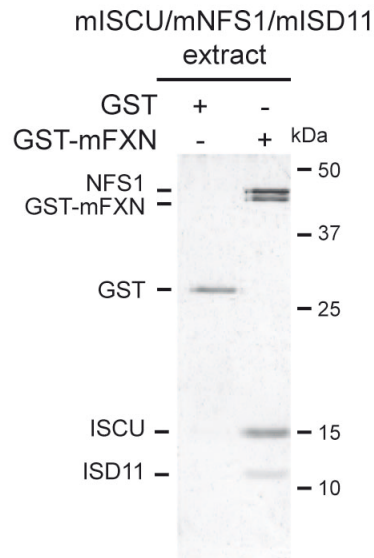
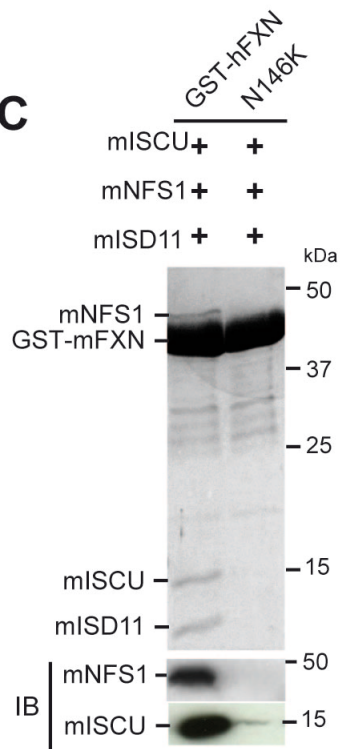
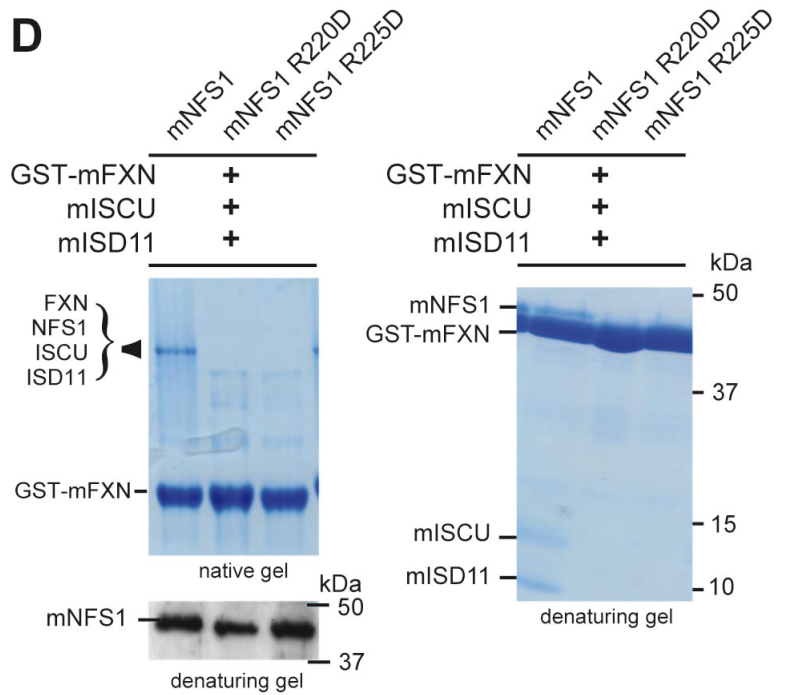
**A****B****C****D**

Figure S3 : Frataxin interaction with ISCU/NFS1/ISD11 complex and effects of mutations.

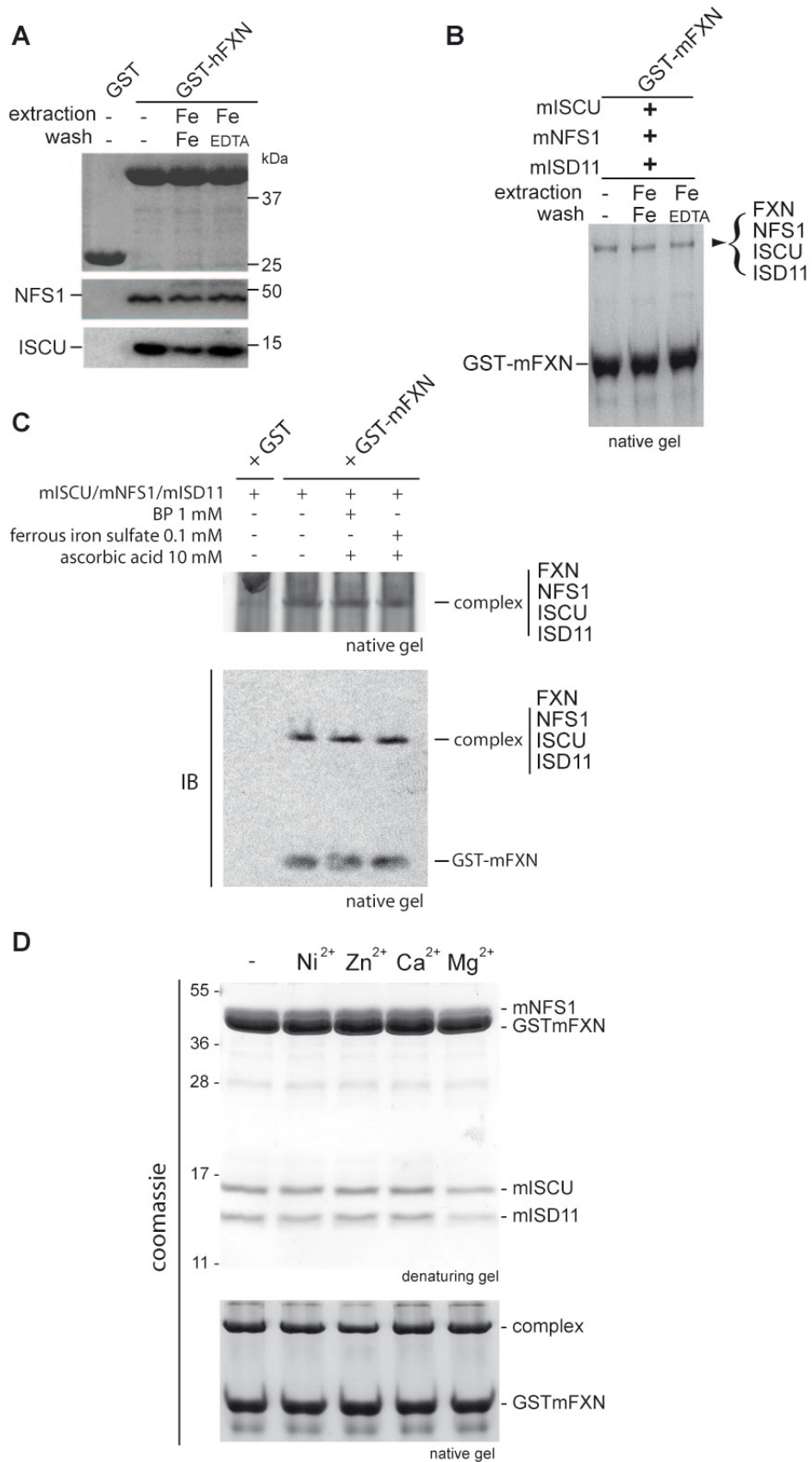


Figure S4 : Absence of effect of different metals on complex formation.

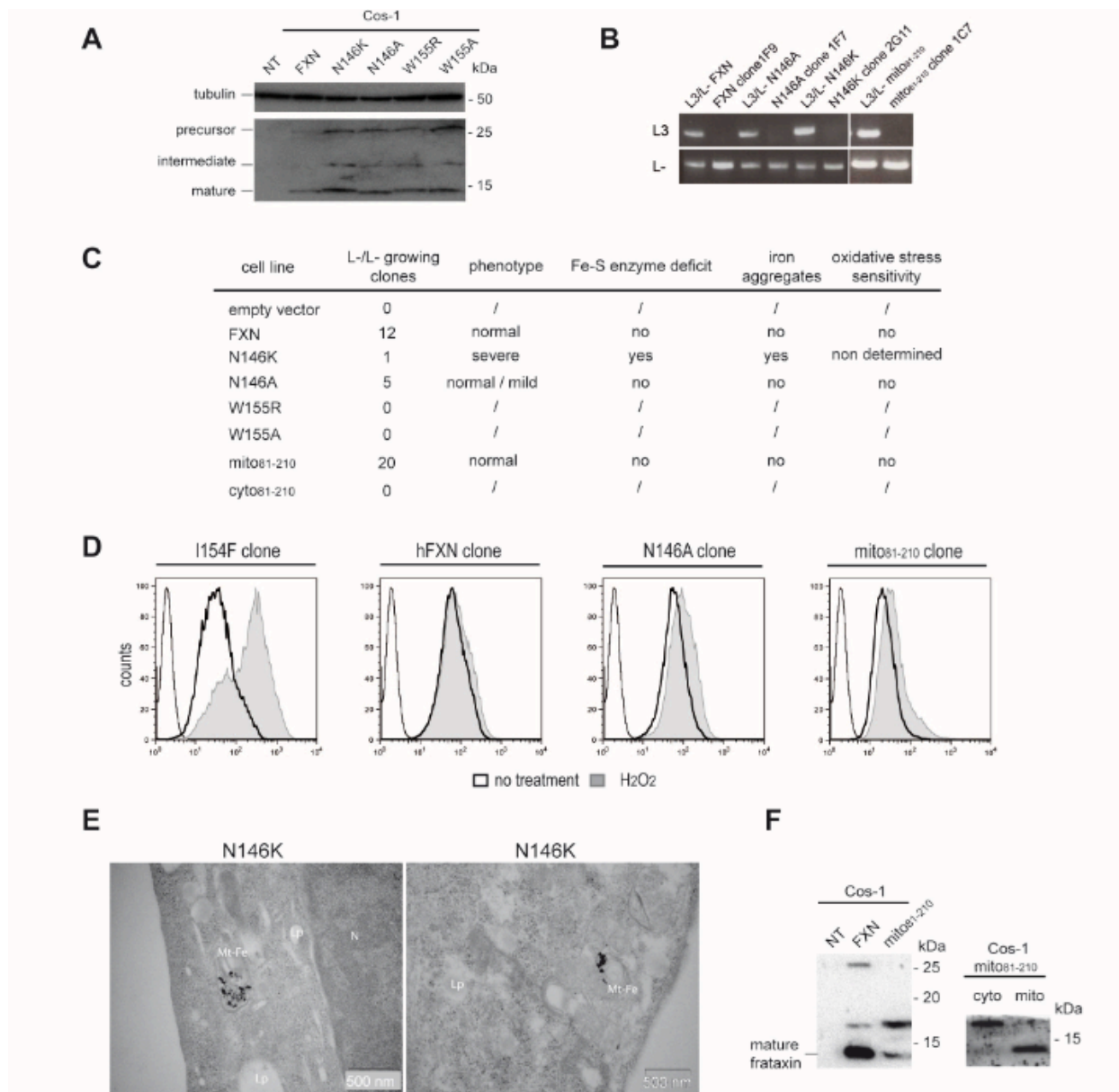


Figure S5 : Characterization of fibroblast cell clones carrying wild type or mutant FXN.

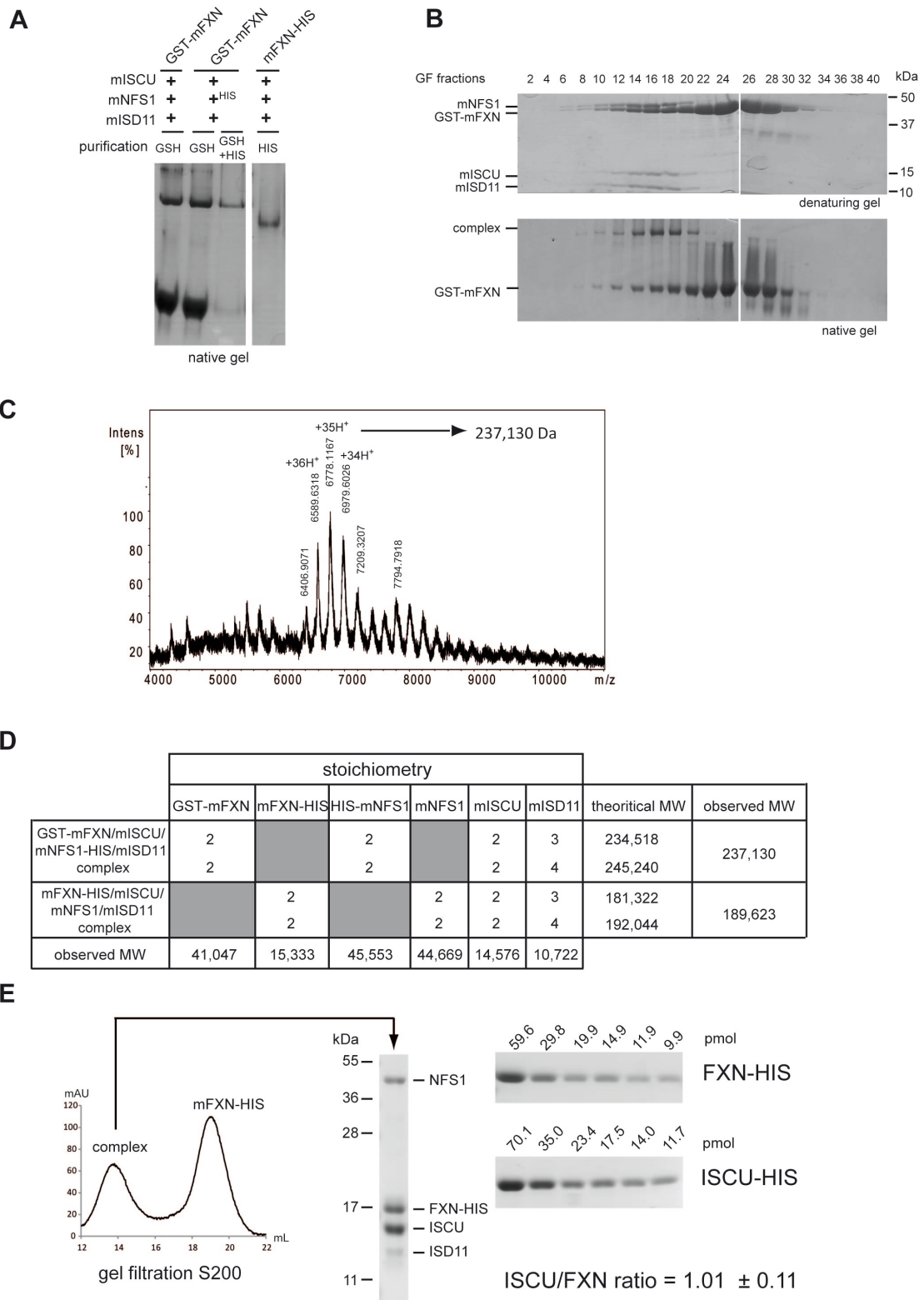


Figure S6 : Purification and characterisation of the FXN/  
NFS1/ISCU/ISD11 complex.

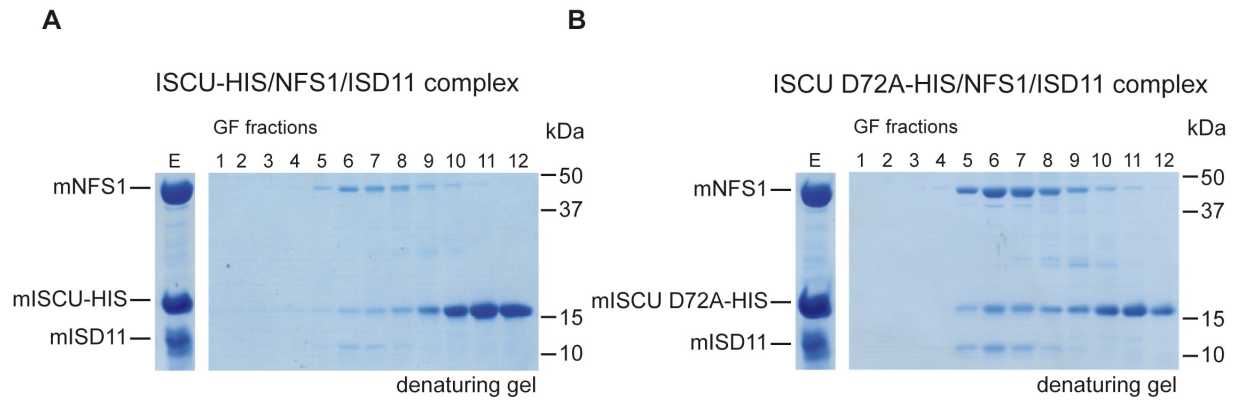


Figure S7 : Purification of the mISCU/mNFS1/mISD11 ternary complex.

## 1 SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS S1

2 **Expression plasmids and mutagenesis.** For mammalian expression, hFXN or hFXN-FLAG were cloned  
3 between EcoRI and XhoI sites of pcDNA3.1(+) vector. Cloning of mito81-210 into pcDNA3.1(+) vector  
4 was performed by PCR amplifying fragment 1-41 and 81-210 of hFXN separately and by introducing a  
5 XbaI restriction site for ligation. hFXN (aa 81-210) and mFXN (aa 76-207) were cloned into pGEX4T1  
6 vector using EcoRI and XhoI restriction sites. For bacterial co-expression, mISCU and mFXN were  
7 cloned into pACYCDuet-1 or pETDuet-1 vectors using NcoI and XhoI restriction sites. mNFS1 cDNA,  
8 without the predicted mitochondrial targeting sequence, was cloned into pENTR-1 vector using EcoRI and  
9 XhoI restriction sites and was then subcloned, using Gateway® technology, into pCo0GWS, containing  
10 the mISD11 cDNA between the NdeI and BamHI restriction sites. Mutagenesis was performed by PCR  
11 directed mutagenesis as previously described [1]. All constructs were verified by sequencing.

12 **Recombinant protein expression and purification.** Transformed BL21 bacteria were cultured in 2xYT  
13 in the presence of the relevant antibiotic to reach 0.5 O.D.<sub>600</sub>. IPTG 0.1-0.5mM was added to induce  
14 recombinant protein production for 3-8 hours. The bacterial pellet was resuspended in cold PBS-TND  
15 (PBS, 1% Triton X-100, 1% IGEPAL, DTT 10mM and Complete protease inhibitor cocktail (Roche)),  
16 sonicated 5 min at 4°C (amplitude 30%), and incubated 15 min on ice.

17 **Antibody dilutions.** anti-frataxin 1/1,000 (R1250), anti-β-tubulin 1/10,000 (IGBMC), anti-aconitase  
18 1/10,000 (R2377), anti-ferrochelatase 1/1,000 (R2381), anti-MnSOD 1/5,000 (SOD-110, Stressgen), anti-  
19 NFS1 1/2,000 (kindly provided by Cécile Bouton), anti-ISCU 1/2,000 (R2385, against peptide  
20 CKLQIQVDEKGGKIVDARFK), anti-ISD11 1/5,000 (kindly provided by Cécile Bouton). HRP-coupled  
21 secondary antibodies were diluted at 1/5,000.

22 **Mass spectrometry analysis.** NanoLC-nanoESI/MS<sup>2</sup> was performed on a linear ion trap LTQ XL  
23 (Thermo FisherScientific) with nano-ESI source interfaced to an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex).  
24 Samples were first desalted and concentrated on a reverse phase precolumn 300 μm i.d x 5 mm for 3 min  
25 at 20 μL/min. Protein digests were then separated on a Pepmap C18, 15 cm x 75 μm i.d (Dionex). The  
26 HPLC gradient was 5-60% solvent B (A = 5% acetonitrile, 0.1% formic acid; B = 80% acetonitrile, 0.08%  
27 formic acid) in 40 min at a flow rate of 200 nL/min. MS/MS spectra were recorded in the data dependent  
28 mode on the five most intense ions observed in MS scan recorded in the mass range m/z 400-1600, the  
29 enhanced scan rate was used for the full MS spectrum. A micro zoom scan was acquired before MS/MS  
30 acquisition scans to determine the peptide charge. Parameters for acquiring CID MS/MS spectra were as  
31 follows; activation time = 30 ms, activation Q = 0.25, relative collision energy = 35% and an isolation  
32 width of 3 m/z. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 30 s to  
33 limit duplicate spectra. Proteome Discoverer 1.1 (Thermo Fisher Scientific) with Sequest® search engine  
34 was used for spectra preprocessing protein ID. The searches were conducted against the human Swissprot

35 database (version 57.9, 512,205 entries). Database searches were performed with the following fixed  
36 parameters; precursor mass tolerance of +/- 0.5 Da, product ion mass tolerance +/- 0.8 Da, and 2 missed  
37 cleavages, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and methionine oxidation as variable  
38 modification. Sequest® results were filtered with Xcorr versus charge state 0.7-1, 2.2-2, 2.5-3, 2.75-4.  
39 ESI-MS (electrospray ionisation mass spectrometry) mass spectra were acquired on a time-of-flight mass  
40 spectrometer (MicrOTOF II, Bruker Daltonic) equipped with an electrospray source. Calibration of the  
41 instrument from m/z 4000-15000 was performed using the cesium iodide (CsI) clusters generated by  
42 spraying a solution of CsI in water/2-propanol 50/50 v/v at a concentration of 1 mg/mL. The sample was  
43 infused in the mass spectrometer via a syringe pump (kdScientific) at a flow rate of 3 µL/min. The mass  
44 spectrometer was controlled via the MicrOTOF control software (version 2.3). The voltage applied was  
45 4.5 kV. The nebulizer gas pressure was 8.7 psi. The source temperature was kept at 160°C. All  
46 measurements were performed in the positive ion mode. The optimal instrumental conditions to observe  
47 protein complexes were capillary exit voltage 200 V, skimmer1 35 V, hexapole1 21 V, hexapole RF 800  
48 Vpp. Data were acquired for 1 minute. Before data processing, each spectrum was smoothed (Gauss  
49 smooth, 0.3 Da) with the DataAnalysis software (version 4.0).

- 50
- 51 1. Schmucker, S., et al. (2008) The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin  
52 *Hum Mol Genet* 17, 3521-31.

53  
54  
55







## **Annexe 2 : Références bibliographiques des tableaux 2, 3 et 4**

1. Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S. R. & Pastore, A. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Human molecular genetics* **11**, 1865–77 (2002).
2. Adinolfi, S. *et al.* Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature structural & molecular biology* **16**, 390–6 (2009).
3. Nair, M. *et al.* Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure (London, England : 1993)* **12**, 2037–48 (2004).
4. Prischi, F. *et al.* Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nature communications* **1**, 95 (2010).
5. Pastore, C., Franzese, M., Sica, F., Temussi, P. & Pastore, A. Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein—a study of bacterial frataxin. *The FEBS journal* **274**, 4199–210 (2007).
6. Karlberg, T. *et al.* The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure (London, England : 1993)* **14**, 1535–46 (2006).
7. Gakh, O., Smith, D. Y. & Isaya, G. Assembly of the iron-binding protein frataxin in *Saccharomyces cerevisiae* responds to dynamic changes in mitochondrial iron influx and stress level. *The Journal of biological chemistry* **283**, 31500–10 (2008).
8. Li, H., Gakh, O., Smith, D. Y. & Isaya, G. Oligomeric yeast frataxin drives assembly of core machinery for mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21971–80 (2009).
9. Soderberg, C. a G. *et al.* The molecular basis of iron-induced oligomerization of frataxin and the role of the ferroxidation reaction in oligomerization. *The Journal of biological chemistry* **288**, 8156–8167 (2013).
10. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. J. & Craig, E. a. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO reports* **5**, 1096–101 (2004).
11. Gakh, O. *et al.* Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Human molecular genetics* **15**, 467–79 (2006).
12. Foury, F., Pastore, A. & Trincal, M. Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO reports* **8**, 194–9 (2007).
13. Correia, A. R., Wang, T., Craig, E. A. & Gomes, C. M. Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region. *The Biochemical journal* **426**, 197–203 (2010).
14. Wang, T. & Craig, E. a. Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *The Journal of biological chemistry* **283**, 12674–9 (2008).
15. Ramazzotti, A., Vanmansart, V. & Foury, F. Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **557**, 215–220 (2004).
16. Leidgens, S., De Smet, S. & Foury, F. Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its beta-sheet. *Human molecular genetics* **19**, 276–86 (2010).
17. He, Y. *et al.* Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferroxidase interaction. *Biochemistry* **43**, 16254–62 (2004).
18. Cook, J. D. *et al.* Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* **45**, 7767–77 (2006).
19. Cook, J. D. *et al.* Molecular details of the yeast frataxin-Isu1 interaction during mitochondrial Fe-S cluster assembly. *Biochemistry* **49**, 8756–65 (2010).
20. Gentry, L. E., Thacker, M. a, Doughty, R., Timkovich, R. & Busenlehner, L. S. His86 from the N-terminus of frataxin coordinates iron and is required for Fe-S cluster synthesis. *Biochemistry* (2013). doi:10.1021/bi400443n
21. Huang, J., Dizin, E. & Cowan, J. A. Mapping iron binding sites on human frataxin: implications for cluster assembly on the ISU Fe-S cluster scaffold protein. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **13**, 825–36 (2008).
22. Schmucker, S. *et al.* Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS one* **6**, e16199 (2011).
23. Santos, R. *et al.* Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* **13**, 651–90 (2010).
24. Correia, A. R., Pastore, C., Adinolfi, S., Pastore, A. & Gomes, C. M. Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *The FEBS journal* **275**, 3680–90 (2008).
25. Bridwell-Rabb, J., Winn, A. M. & Barondeau, D. P. Structure-Function Analysis of Friedreich's Ataxia Mutants Reveals Determinants of Frataxin Binding and Activation of the Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry* **165**, (2011).
26. Rufini, A. *et al.* Preventing the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in Friedreich's ataxia. *Human molecular genetics* **20**, 1253–61 (2011).
27. Lavecchia, A. Discovery of a Novel Small Molecule Inhibitor Targeting the Frataxin/Ubiquitin Interaction via Structure-Based Virtual Screening and Bioassays. *Journal of medicinal chemistry* (2013). doi:10.1021/jm3017199
28. Tsai, C., Bridwell-Rabb, J. & Barondeau, D. P. Friedreich's Ataxia Variants I154F and W155R Diminish Frataxin-Based Activation of the Iron-Sulfur Cluster Assembly Complex. *Biochemistry* **50**, 6478–87 (2011).
29. Correia, A. R., Adinolfi, S., Pastore, A. & Gomes, C. M. Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *The Biochemical journal* **398**, 605–11 (2006).
30. Li, H., Gakh, O., Smith, D. Y., Ranatunga, W. K. & Isaya, G. Missense mutations linked to friedreich ataxia have different but synergistic effects on mitochondrial frataxin isoforms. *The Journal of biological chemistry* **288**, 4116–27 (2013).
31. Dhe-Paganon, S., Shigetani, R., Chi, Y. I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal structure of human frataxin. *The Journal of biological chemistry* **275**, 30753–6 (2000).
32. Prischi, F., Giannini, C., Adinolfi, S. & Pastore, A. The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *The FEBS journal* **276**, 6669–76 (2009).
33. Bencze, K. Z. *et al.* Human frataxin: iron and ferroxidase binding surface. *Chemical communications (Cambridge, England)* 1798–800 (2007). doi:10.1039/b703195e
34. O'Neill, H. a, Gakh, O. & Isaya, G. Supramolecular assemblies of human frataxin are formed via subunit-subunit interactions mediated by a non-conserved amino-terminal region. *Journal of molecular biology* **345**, 433–9 (2005).
35. Correia, A. R., Ow, S. Y., Wright, P. C. & Gomes, C. M. The conserved Trp155 in human frataxin as a hotspot for oxidative stress related chemical modifications. *Biochemical and biophysical research communications* **390**, 1007–11 (2009).
36. Roman, E. a *et al.* Protein stability and dynamics modulation: the case of human frataxin. *PLoS one* **7**, e45743 (2012).

## Résumé

L'Ataxie de Friedreich est une maladie génétique récessive neurodégénérative. Elle est due à un déficit dans l'expression d'une protéine mitochondriale, la frataxine. Cette protéine est impliquée dans l'assemblage des protéines fer-soufre (FeS). Le premier axe de ma thèse a consisté à mieux caractériser le rôle de la frataxine au sein du complexe précoce de biosynthèse des clusters FeS (NFS1/ISD11/ISCU). Mes résultats m'ont permis de mettre en évidence l'importance de la frataxine dans le contrôle de l'entrée du fer au sein du complexe de biosynthèse, sur l'activité enzymatique de NFS1 et sur le transfert des clusters FeS vers les apo-protéines. Le second axe a été le développement du programme de bioinformatique (PredISC) nous permettant des candidats de protéines FeS. Ce programme a permis de générer une liste de candidat qui pourra être compilée sous la forme d'une base de données. Par la suite, des approches transversales y seront associées afin d'affiner les listes de candidats.

## Mots Clés

Frataxine - Clusters Fer-Souffre - Ataxie de Friedreich - Protéines Fer-Souffre - Machinerie ISC - NFS1 - ISCU - ISD11

## Résumé en anglais

Friedreich Ataxia (FA) is the most prevalent form of autosomal recessive ataxia in the Caucasian population. Frataxin is implicated in the biosynthesis of iron-sulfur (FeS). The first axis of my work was to better characterize the function of Frataxin in the "early" complex of FeS clusters biosynthesis (NFS1/ISD11/ISCU). I was able to show the crucial involvement of Frataxin in the control of iron entry in this complex, on the enzymatic activity of NFS1 and on the transfert of FeS cluster to apo-proteins. The second axis was the development of a bio-informatic software (PredISC) that is able to predict potential iron-sulfur containing proteins. The software allows us to generate a list of candidates that will be compiled in a database. In the future transversal approaches have to be associated in order to reduced the number of candidates, and increase their interest.

## Keywords

Frataxin - Fer-Sulfur Clusters - Friedreich Ataxia - Fer-Sulfur Proteins - ISC machinery - NFS1 - ISCU - ISD11