

Biosynthèse de l'ubiquinone : étude biochimique de Coq6 de S. cerevisiae, impliquée dans l'hydroxylation en C-5

Lucie Gonzalez

► To cite this version:

Lucie Gonzalez. Biosynthèse de l'ubiquinone : étude biochimique de Coq6 de S. cerevisiae, impliquée dans l'hydroxylation en C-5. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066327 . tel-01647198

HAL Id: tel-01647198 https://theses.hal.science/tel-01647198

Submitted on 24 Nov 2017

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.



Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 406

Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques UMR 8229 (Collège de France, UPMC, CNRS)

Biosynthèse de l'ubiquinone : étude biochimique de Coq6 de *S. cerevisiæ*, impliquée dans l'hydroxylation en C-5

Par Lucie GONZALEZ

Thèse de doctorat de Biochimie

Dirigée par Marc FONTECAVE et codirigée par Murielle LOMBARD

Présentée et soutenue publiquement le 20 octobre 2015

Devant un jury composé de :

Axel MAGALON, Directeur de Recherche, CNRS, Université Aix Marseille, Rapporteur Michael MARDEN, Directeur de Recherche, INSERM, Université Paris Est, Rapporteur Fabien PIERREL, Chargé de Recherche, CNRS, Université Grenoble Alpes, Examinateur Sandrine SAGAN, Directrice de Recherche, CNRS, UPMC, Examinatrice Marc FONTECAVE, Professeur au Collège de France, Directeur de thèse Murielle LOMBARD, Chargée de Recherche, CNRS, Collège de France, Co-directrice de thèse

CC (Second Seco

A mis abuelos, con mucho cariño.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
CHAPITRE I : Introduction bibliographique	5
l) Le coenzyme Q	7
I.1) Structure et localisation	7
I.2) Propriétés rédox	8
I.3) Fonctions	9
I.3.a) Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale	9
i) Des complexes I (NADH-coenzyme Q-oxydoréductase) et II (succinate-coenzyme Q- oxydoréductase)	10
ii) au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase)	12
I.3.b) Antioxydant membranaire (Bentinger <i>et al.</i> 2007)	13
I.3.c) Autres fonctions proposées (Bentinger <i>et al.</i> 2010)	15
II) Biosynthèse du coenzyme Q	16
II.1) Biosynthèse des métabolites	16
II.1.a) Précurseurs du noyau aromatique	
II.1.b) Biosynthèse du farnésylpyrophosphate (FPP) et de l'isopentényl-pyphosphate (I	IPP)18
II.2) Voie de la biosynthèse de l'ubiquinone	
II.2.a) Biosynthèse de l'acide hexaprénylhydroxybenzoïque (HHB)	
i) Biosynthèse de la chaîne hexaprényle : Coq1	19
ii) Couplage de la chaîne hexaprényle : Coq2	19
II.2.b) Modification du noyau aromatique et mise en évidence d'un complexe multipr	otéique
	20
i) Modification du noyau aromatique	20
ii) Etudes in vitro réalisées avec des enzymes directement impliquées dans la modification d aromatique	lu noyau 23
iii) Composition et rôle du complexe	24
II.3) Mutations et déficience en coenzyme Q chez l'Homme (Doimo <i>et al.</i> 2014)	26

III) Coq6 de S. cerevisiæ, monooxygénase à flavine catalysant l'hydroxylation en C-5 de l'ubiquinone
III.1) Une monooxygénase à flavine de classe A28
III.1.a) Généralités sur les monooxygénases à flavine28
III.1.b) Mécanisme enzymatique, exemple de PHBH31
III.2) Hydroxylation en C-5 et substrat de Coq632
III.2.a) Preuve de l'implication de Coq6 dans l'hydroxylation en C-5
III.2.b) Identité chimique du substrat de Coq633
III.3) Une source d'électrons atypique : l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine
III.3.a) Preuves <i>in vivo</i>
III.3.b) Adrénodoxine réductase et adrénodoxine34
i) Généralités sur les ferrédoxines NADP $^{+}$ réductases (FNR)
ii) Généralités sur les protéines à centre Fe-S (Lill 2009)
iii) Fonctions connues de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine
IV) Objectifs de la thèse
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes
I) Matériel biologique41
I.1) Souches bactériennes41
I.2) Vecteurs plasmidiques42
I.3) Milieu de culture45
II) Biologie moléculaire46
II.1) Préparation de bactéries compétentes46
II.2) Transformation de bactéries par choc thermique46
II.3) Extraction et purification de plasmides47
III) Méthodes biochimiques47
III.1) Analyse des protéines et électrophorèse47
III.1.a) Dosage de protéines47
III.1.b) Electrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes47

III.1.c) Western Blot	49
III.2) Surexpression et purification des protéines	50
III.2.a) mBP-Coq6 de <i>S. cerevisiæ</i> , 96,5 kDa	50
i) Surexpression et récupération des extraits solubles	50
ii) Colonne d'affinité dextrine Sepharose	51
iii) Colonne d'exclusion stérique Superdex S200	51
III.2.b) Δ 1-24Coq6 de Saccharoyces cerevisi a , 51,5 kDa	52
i) Clivage par le facteur Xa	52
ii) Colonne échangeuse d'anions Uno Q1	52
III.2.c) Adrénodoxine réductase humaine (hAdR), 51.7 kDa	53
i) Surexpression et récupération des extraits solubles	53
ii) Colonne d'affinité Ni Sepharose	53
iii) Colonne d'exclusion stérique Superdex S75	54
III.2.d) ScAdx de <i>S. cerevisiæ</i> , 12,7kDa	54
i) Surexpression et récupération des extraits solubles	54
ii) Colonne échangeuse d'anions Uno Q6	54
iii) Colonne de tamisage moléculaire Superdex S75	54
III.3) Evaluation des cofacteurs	55
III.3.a) Dosage du fer	55
III.3.b) Dosage du soufre	55
III.3.c) Caractérisation des flavines	56
i) Détermination de la nature des flavines par HPLC	56
ii) Détermination du taux de flavine	56
III.3.d) Titration des cofacteurs des enzymatiques	57
III.4) Tests d'activité de Coq6 de S. cerevisiæ	57
III.4.a) Conditions expérimentales	57
III.4.b) Analyse HPLC sur colonne C18	58
IV) Analogues de substrats	59
IV.1) Acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (FHB)	60
IV.2) Acide 3-farnésyl-4,5-dihydroxybenzoïque (FHB-OH)	63

IV.3) Farnésylhydroquinone (FHQ)67
IV.4) Farnésylphénol (FPol)70
IV.5) Farnésylcatéchol (FCat)73
V) Méthodes biophysiques75
V.1) Spectroscopie d'absorption UV-visible75
V.2) <i>Stopped flow</i> en anaérobiose76
V.2.a) Conditions expérimentales76
V.2.b) Modélisation de la réaction77
V.3) Spectroscopie de fluorescence78
V.3.a) Origine de la fluorescence78
V.3.b) Inhibition de la fluorescense79
RESULTATS81
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de <i>S. cerevisiæ</i>
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de <i>S. cerevisiæ</i>
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction. 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6 81 II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa
 CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6 91 II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa 93 III) Purification de Δ1-24Coq6 de S. cerevisiæ
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6 91 II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa 93 III) Purification de Δ1-24Coq6 de S. cerevisiæ 94 III.1) Surexpression et purification de MBP-Δ1-24Coq6 96
 CHAPITRE III: Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6 91 II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa 93 III) Purification de Δ1-24Coq6 de S. cerevisiæ 94 III.1) Surexpression et purification de MBP-Δ1-24Coq6 96 III.2) Clivage du lien entre la MBP et Δ1-24Coq6 par le facteur Xa
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire deCoq6 de S. cerevisiæ83I) Introduction85II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ89II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose89II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq691II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa93III) Purification de $\Delta 1$ -24Coq6 de S. cerevisiæ94III.1) Surexpression et purification de MBP- $\Delta 1$ -24Coq696III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98III.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq699
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire deCoq6 de S. cerevisiæ83I) Introduction85II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ89II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose89II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq691II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa93III) Purification de $\Delta 1$ -24Coq6 de S. cerevisiæ94III.1) Surexpression et purification de MBP- $\Delta 1$ -24Coq696III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98III.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98III.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98IV) Caractérisation de la flavine de Coq6102
CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire deCoq6 de S. cerevisiæ83I) Introduction85II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ89II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose89II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq691II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa93III) Purification de $\Delta 1$ -24Coq6 de S. cerevisiæ94III.1) Surexpression et purification de MBP- $\Delta 1$ -24Coq696III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98III.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa98III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq691II.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq691IV) Caractérisation de la flavine de Coq6102IV.1) Titration de la flavine par le dithionite102
CHAPITRE III: Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de S. cerevisiæ 83 I) Introduction 85 II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ 89 II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose 89 II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6 91 II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa 93 III) Purification de $\Delta 1$ -24Coq6 de S. cerevisiæ 94 III.1) Surexpression et purification de MBP- $\Delta 1$ -24Coq6 96 III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa 98 III.3) Comportement oligomérique de $\Delta 1$ -24Coq6 par le facteur Xa 98 III.2) Clivage du lien entre la MBP et $\Delta 1$ -24Coq6 99 IV) Caractérisation de la flavine de Coq6 102 IV.1) Titration de la flavine par le dithionite 102 IV.2) Absence de réduction directe par le NADPH et le NADH 102

V.1) Cristaux de MBP-Coq6104
V.2) Construction et étude d'un modèle bioinformatique par homologie de Coq6 de S. cerevisiæ105
VI) Conclusion109
CHAPITRE IV : Mise en évidence d'une chaîne de transfert d'électrons à Coq6
I) Introduction113
II) Caractérisation biochimique de l'adrénodoxine réductase humaine, hAdR113
II.1) Optimisation de la surexpression de l'adrénodoxine réductase humaine, hAdR114
II.1.a) Influence de la température de culture114
II.1.b) Influence du moment d'induction114
II.1.c) Influence de la souche bactérienne choisie115
II.1.d) Influence de la présence de chaperonnes116
II.2) Purification de l'adrénodoxine réductase humaine117
II.2.a) Colonne Ni Sepharose117
II.2.b) Colonne d'exclusion stérique117
II.3) Caractérisation de la flavine de l'adrénodoxine réductase humaine119
II.3.a) Nature et taux de flavine119
II.3.b) Titration de la flavine par le dithionite, le NADPH et le NADH
II.4) Cristallogénèse de hAdR123
III) Adrénodoxine de <i>S. cerevisiæ</i> , ScAdx124
III.1) Surexpression et purification124
III.2) Dosage du fer et du soufre124
III.3) Titration par le dithionite125
IV) Chaîne de transfert d'électrons125
IV.1) Réduction de Coq6 par le NADPH <i>via</i> l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de <i>S. cerevisiæ</i> 126
IV.1.a) Réduction par le NADPH et le NADH126

IV.1.b) Comparaison de Δ 1-24Coq6 et MBP-Coq6128
IV.1.c) Influence des concentrations en hAdR et ScAdx sur la réduction de Δ 1-24Coq6 par le
NADPH129
IV.1.d) Influence de la présence d'analogues de substrat129
IV.2) Transfert d'électrons entre l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de
S. cerevisiæ
IV.3) Transfert d'électron entre l'adrénodoxine réduite et Coq6 de S. cerevisiæ
V) Conclusion
CHAPITRE V : Etude enzymatique de Coq6 avec des analogues de substrat synthétisés137
I) Introduction139
II) Synthèse d'analogues de substrat140
II.1) Protection du noyau aromatique140
II.2) Couplage de la chaîne isoprényle141
II.3) Déprotection et purification en HPLC143
III) Tests enzymatiques de Coq6 de <i>S. cerevisiæ</i> 144
III.1) Mise au point de méthodes de détection des analogues de substrats et de produits de
Coq6 par HPLC144
III.2) Réduction par le NADPH via l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de
S. cerevisiæ146
III.3) Réduction chimique148
III.4) Réduction photochimique par la déazaflavine150
IV) Etude en fluorescence de la liaison de Coq6 aux analogues de substrat152
IV.1) Spectroscopie de fluorescence153
IV.2) Fluorescence en <i>stopped-flow</i> 156
V) Conclusion
CHAPITRE VI : Caractérisation cinétique de l'adrénodoxine réductase humaine : effet du Mg ²⁺ 159
I) Introduction

II) Etudes cinétiques du transfert d'hydrure du NAD(P) à hAdR164
II.1) Etudes à l'état stationnaire164
II.2) Etudes à l'état pré-stationnaire (<i>stopped flow</i>)165
II.2.a) Réduction par le NADH165
II.2.b) Réduction par le NADPH167
III) Interaction de l'adrénodoxine réductase avec le NADP ⁺ 169
III.1) Oxydation de hAdR réduite par le NADP ⁺ 169
III.2) Effet inhibiteur du NADP $^+$ sur le transfert d'électrons en <i>steady state</i> 170
IV) Effet du Mg ²⁺ sur la réduction du FAD de hAdR171
IV.1) Effet du Mg ²⁺ lors des études cinétiques en <i>steady state</i> 171
IV.2) Effet du Mg ²⁺ lors des études cinétiques en <i>stopped flow</i> 173
IV.2.a) Etude en présence de NADPH173
IV.2.b) Etudes en présence de NADH175
V) Conclusion176
CONCLUSION GENERALE
ANNEXE
I) Figures supplémentaires189
II) Article soumis à <i>PLOS Computational Biology</i> 192
III) Résumé et mots clefs en français226
IV) Résumé et mots clefs en anglais227
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABREVIATIONS

APTS	Acide ParaToluèneSulfonique
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
АТР	Adénosine TriPhosphate
BBFO	Broad Band Fluorine Observation
CCD	Charge-Coupled Device
ССМ	Chromatographie sur Couche Mince
DCPIP	DiChloroPhénolIndoPhénol
DIEA	Di-Isopropyl-EthylAmine
DMPD	N,N-Di M éthyl-p-PhénylèneDiamine
DMQ	5- D é M éthoxy Q uinone
DO	Densité Optique
EDTA	acide Ethylène Diamine TétraAcétique
EtOH	Ethanol
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FCat	Farnésyl Cat échol
FHB	acide 3-Farnésyl-4-HydroxyBenzoïque
FHB-OH	acide 3-Farnésyl-4,5-diHydroxyBenzoïque
FHQ	Farnésyl Hydro Quinone
FMN	Flavine MonoNucléotide
FPol	2-FarnésylPhénol
FPP	Farnésyl Pyro Phosphate
FTriol	1-Farnésyl-2,3,5-trihydroxybenzène
GST	Glutathion S-Transférase
НАВ	acide 3-Hexaprényl-4-AminoBenzoïque
НАР	3-Hexaprényl-4-AminoPhénol
HEPES	acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique
ННВ	acide 3-Hexaprényl-4-HydroxyBenzoïque
нно	3-Hexaprényl-4-HydroQuinone
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPol	2-Hexaprényl P hén ol

HRP	HorseRadish Peroxidase, peroxydase de raifort				
IPP	Isopentényl Pyro Phosphate				
IPTG	Isopropyl β-D-1-ThioGalactoPyranoside				
kDa	kilo Dalton				
LB	Lysogeny Broth				
MBP	Maltose Binding Protein				
MeOH	Méthanol				
MES	acide 2-(N- M orpholino)EthaneSulfonique				
МНВ	acide MéthylHydroxyBenzoïque				
MOMCI	Chlorure de MéthOxyMéthyle				
MOPS	acide 3-MorphOlinoPropane-1-Sulfonique				
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme oxydée				
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme réduite				
NADP ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme oxydée				
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite				
рАВ	acide p ara- A mino B enzoïque				
PCA	Acide ProtoCatéchique				
PCD	ProtoCatéchuate Dioxygénase				
PDB	Protein Data Bank				
PEG	PolyEthylène Glycol				
рНВ	acide p ara- H ydroxy B enzoïque				
рНВН	para-HydroxyBenzoate Hydroxylase				
ppm	p artie p ar m illion				
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride, polyfluorure de vinylidène				
Q	Coenzyme Q ou ubiquinone				
R _f	Rapport frontal				
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire				
ROS	Reactive Oxygen Species				
rpm	rotation p ar m inute				
SAM	S-AdénosyleMéthionine				
SDS	DodécylSulfate de Sodium				
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis				

START	STeroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid-Transfer
ТА	Température Ambiante
TEMED	NNN'N'- TE tra M éthyl E thylène D iamine
TFA	Acide TriFluoroAcétique
THF	TétraHydroFurane
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UA	Unité Arbitraire
VC	Volume-Colonne
SEC-MALS	Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Light Scattering

CHAPITRE I : Introduction bibliographique

I) Le coenzyme Q

Le coenzyme Q ou ubiquinone (abréviation : Q) fait partie de la famille des quinones isoprénoïdes. Les quinones isoprénoïdes sont composées d'une tête aromatique hydrophile et d'une queue hydrophobe constituée d'unités isoprénoïdes (5 atomes de carbone), ce qui les rend liposolubles. Elles sont présentes dans la plupart des membranes des organismes vivants.

Leur fonction principale est de transporter des électrons et des protons dans les chaînes respiratoires et photosynthétiques afin de créer une force proton-motrice à travers ces membranes. Cette force proton-motrice sert ensuite à la synthèse d'ATP qui est la forme de stockage chimique de l'énergie dans la cellule. Ces quinones possèdent également d'autres fonctions, notamment celle d'antioxydant membranaire.

La plupart des quinones isoprénoïdes appartiennent à la famille des naphtoquinones ou des benzoquinones, cf. Schéma 1. Parmi les naphtoquinones, les ménaquinones participent au transfert d'électrons dans les chaînes respiratoire et photosynthétique des bactéries. Dans la famille des benzoquinones, on trouve les ubiquinones qui transfèrent les électrons dans la chaîne respiratoire des eucaryotes et de certaines bactéries (dont *E. coli*) ainsi que les plastoquinones qui participent au transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique au sein des chloroplastes chez les plantes et les archées (Nowicka *et* Kruk 2010).



Schéma 1 : Exemples de naphtoquinone et de benzoquinones. Naphtoquinone : MK8, Ménaquinone 8 présente chez *E. coli*. Benzoquinones : Q10, Coenzyme Q 10 présent chez l'homme; PQ9, Plastoquinone 9 présente chez les cyanobactéries et les plantes

I.1) Structure et localisation

L'ubiquinone est composée d'un noyau quinone substitué par deux groupes méthoxy, un groupe méthyle et une chaîne polyisoprényle, cf. Schéma 2. Son noyau aromatique, hydrophile, lui permet d'interagir avec les protéines : c'est le siège de sa réactivité, liée à ses propriétés rédox (cf. page 8). Du fait de sa longue chaîne hydrophobe, le coenzyme Q est parfaitement soluble dans les bicouches lipidiques mais forme des agrégats micellaires lorsqu'il se trouve en milieu aqueux.



Schéma 2 : Coenzyme Q ou ubiquinone. n=6 chez S. cerevisiæ, n=8 chez E. coli, n=10 chez l'homme.

Le nombre d'unités isoprényles de la chaîne lipophile de l'ubiquinone varie selon les organismes, cf. Tableau 1. Le plus souvent, il existe une forme majoritaire qui coexiste avec des formes à chaînes plus courtes en faibles quantités.

Organisme	Formes détectées		
Homme et grands vertébrés	Q10 (Q9)		
Rongeurs	Q9		
Invertébrés	Q8 à Q10		
Champignons	Q6 à Q10		
S. cerevisiæ	Q6		
Bactéries	Q8 à Q10 (Q1 à Q7)		
E. coli	Q8		
Plantes supérieures	Q9 ou Q10		
Plantes inférieures	Q7 ou Q8		

Tableau 1 : Formes de coenzyme Q détectées chez divers organismes. Par parenthèse, forme(s) minoritaire(s). (Nowicka *et* Kruk 2010)

Chez les procaryotes, l'ubiquinone est présente dans la membrane plasmique. Chez *S. cerevisiæ*, on la retrouve principalement dans la membrane interne des mitochondries. Chez les plantes, l'ubiquinone est présente en majorité dans les mitochondries et on en trouve des traces dans la plupart des membranes excepté au sein des chloroplastes (Swiezewska *et al.* 1993). Chez les mammifères, elle est présente dans les membranes biologiques de tous les tissus ainsi que dans le sang, au sein de lipoprotéines (Ernster *et* Dallner 1995).

I.2) Propriétés rédox

Le noyau quinone du coenzyme Q lui confère des propriétés rédox et acidobasiques qui lui permettent d'agir comme transporteur d'électrons et de protons mais aussi comme antioxydant. L'ubiquinone existe sous six formes, cf. Schéma 3. La forme totalement réduite est nommée ubiquinol (QH₂) et forme avec l'ubiquinone un couple Q/QH₂ dont le potentiel standard est de 112 mV : il y a échange de deux protons et deux électrons.



Schéma 3 : Constantes physiques associées au coenzyme Q déterminées dans 80% éthanol. (Rich 1984)

I.3) Fonctions

Grâce à son noyau quinone et sa longue chaîne hydrophobe, l'ubiquinone joue un rôle essentiel dans la chaîne respiratoire en transférant les électrons depuis les complexes I et II jusqu'au complexe III, dans la membrane plasmique chez les procaryotes et dans la membrane interne de la mitochondrie chez les eucaryotes. Chez les mammifères, il s'agit du seul antioxydant liposoluble synthétisé *de novo*. Par ailleurs, l'ubiquinone est impliquée dans la régulation des pores de transition membranaire mitochondriaux et dans le transport de protons permettant le fonctionnement des protéines découplantes, cf. page 15 (Laredj *et al.* 2014).

I.3.a) Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale

Le coenzyme Q est un élément essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une fois réduit par le complexe I ou le complexe II, il va transmettre ses électrons au complexe III, ce qui permettra de réduire le cytochrome *c*. Le cytochrome *c* va lui-même transférer ses électrons au complexe IV, ce qui aboutit à la réduction à quatre électrons du dioxygène moléculaire O₂, l'accepteur d'électrons final, en eau H₂O. L'ensemble de ces réactions va permettre de générer un gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie. Le flux de protons résultant pour rétablir l'équilibre permet à l'ATP synthase de fonctionner et de stocker l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP, cf. Figure 1.





Figure 1 : La chaîne de transport d'électrons. Les structures présentées sont : complexe I de *Thermus thermophilus* (code PDB 1BGY), complexe II du cochon sauvage *Sus scrofa* (code PDB 1ZOY), complexe III de *Bos taurus* (code PDB 1BGY) et complexe IV de *Bos taurus* (code PDB 1OCC). La structure de l'ATP synthase est issue de l'assemblage au sein d'une structure d'ensemble obtenue par cryomicroscopie électronique (résolue à 18 Å) de plusieurs structures de sous-complexes cristallisés séparément; certaines unités non encore cristallisées ne sont pas représentées. IMS : espace intermembranaire, $\Delta \Psi$: potentiel membranaire. (Sazanov 2015)

i) Des complexes I (NADH-coenzyme Q-oxydoréductase) et II (succinate-coenzyme Q-oxydoréductase)...

Le coenzyme Q est réduit soit par le complexe I, également appelé NADH-coenzyme-Qoxydoréductase, soit par le complexe II, également nommé succinate-coenzyme-Qoxydoréductase.

Le complexe I, cf. Figure 2, a été cristallisé dans son intégralité pour la première fois par Baradaran *et al.* en 2013 (*Thermus thermophilus*). Il est composé de trois modules : le module N comportant une NADH-oxydase, le module Q qui réduit l'ubiquinone et le module P, qui sert à la translocation des protons. Les deux premiers modules sont essentiellement dans la matrice mitochondriale (cytoplasme dans le cas de *T. thermophilus* qui est une bactérie). Le module N transfère les électrons depuis le NADH *via* un FMN puis plusieurs centres Fe-S jusqu'au module Q qui permet la réduction de l'ubiquinone en lui transférant les électrons *via* d'autres centres Fe-S. Le FMN, qui peut transférer les électrons un par un, assure le transfert d'électrons entre le NADH, qui donne deux électrons à la fois sous forme d'hydrure H⁻, et les centres Fe-S, qui ne peuvent recevoir qu'un électron à la fois. Le module P, quant à lui, est transmembranaire et composé d'hélices α qui forment des demi-canaux de transport de protons. En fonction de l'état d'oxydation de l'ubiquinone, ces demi-canaux s'ouvrent et se ferment, permettant la translocation de protons

depuis la matrice mitochondriale jusqu'à l'espace intermembranaire (du cytoplasme au périplasme dans le cas de *T. thermophilus*).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 2 : Proposition de fonctionnement pour le complexe I. Les modules N et Q sont en gris, le module P en couleur. Les changements conformationnels du module NADH-oxydase N2 sont indiqués en pointillés et ceux affectant le module P en gris. Les transferts de protons possibles sont indiqués par des flèches noires et les résidus participant au transfert des protons sont représentés par des disques (rouges pour les glutamates, bleu pour les lysines et les histidines, blanc pour la tyrosine). (Sazanov 2015)

La première structure complète du complexe II d'un organisme eucaryote, composée de quatre protéines, a été obtenue en 2005 par Sun *et al.* Deux des protéines sont hydrophiles et situées dans la matrice mitochondriale : une flavoprotéine (Fp) et une protéine à centres Fe-S (Ip). Les deux autres (CybL et CybS), en contact avec la protéine à centres Fe-S, lient un hème. La flavoprotéine à FAD oxyde le succinate en fumarate et transfère les électrons récupérés à la protéine à centres Fe-S. Cette dernière transfère alors ses électrons à l'hème, permettant ainsi la réduction de l'ubiquinone, cf. Figure 3.



Figure 3 : Structure du complexe II de *Sus scrofa* (cochon sauvage) et schéma du transfert d'électrons. Les différents groupes prosthétiques participant au transfert d'électrons sont représentés ainsi que l'ubiquinone (UQ) avec leurs distances centre à centre et leurs potentiels rédox, le sens du transfert d'électrons est indiqué par des flèches. (Sun *et al.* 2005)

ii) ... au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase)

Une fois réduite par le complexe I ou le complexe II, l'ubiquinone transfère ses électrons au complexe III. Son transfert des complexes I et II au complexe III se fait par la libre diffusion de l'ubiquinol dans la membrane interne mitochondriale. Il a toutefois été montré par microscopie électronique que les complexe I et III pouvaient s'assembler en un supercomplexe : l'ubiquinone peut alors passer directement d'un complexe à l'autre (Lenaz *et* Genova 2009).

La première structure complète du complexe III d'un organisme eucaryote, également nommé complexe cytochrome *bc1*, a été obtenue en 1998 par Iwata *et al.* Le complexe III est formé de trois sous-unités : la protéine de Rieske contenant un centre [2Fe-2S], le cytochrome *c1* porteur d'un hème et le cytochrome *b* porteur de deux hèmes. Mitchelle a proposé en 1975 l'hypothèse d'un transfert d'électron cyclique en deux étapes impliquant plusieurs formes du coenzyme Q et permettant la translocation des protons à travers la membrane et la réduction du cytochrome *c*, cf. Figure 4.

Lors de la première étape, on a fixation et oxydation d'une molécule d'ubiquinol au site Q₀. Deux protons sont alors injectés dans l'espace intermembranaire et deux électrons récupérés puis séparés :

un des deux électrons est transféré le long d'une chaîne à haut potentiel au centre [2Fe 2S] de la protéine de Rieske puis à l'hème du cytochrome *c1* et enfin au cytochrome *c*, transporteur soluble dans l'espace intermembranaire;

l'autre électron suit une chaîne de bas potentiel via les deux hèmes de type b jusqu'au site Q₁ où il va réduire une molécule d'ubiquinone Q en ubisemiquinone Q^{•-}.

Lors de la deuxième étape, la réduction d'une deuxième molécule d'ubiquinol permet l'injection de deux protons supplémentaires dans l'espace intermembranaire ainsi que la réduction d'un deuxième cytochrome c et le transfert d'un électron à l'ubisemiquinone Q^{•-}. Deux protons récupérés de la matrice permettent alors de former l'ubiquinol QH₂ au site Q₁.

Au final, on a : $QH_2 + 2 \operatorname{cyt} c^{3+} + 2H^+_{de \text{ la matrice}} \rightarrow Q + 2 \operatorname{cyt} c^{2+} + 4H^+_{dans l'espace intermembranaire}$



Figure 4 : Schéma de fonctionnement du complexe III. Première étape indiquée par les flèches continues, deuxième étape indiquée par les flèches en pointillés. (Sazanov 2015)

I.3.b) Antioxydant membranaire (Bentinger et al. 2007)

Les antioxydants ont un rôle clef dans le bon fonctionnement cellulaire car ils permettent de limiter les dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'apparition de ROS est due en partie à la fuite d'espèces actives lors de l'activation de l'oxygène moléculaire dans des réactions enzymatiques, notamment dans le processus de respiration, mais peuvent aussi résulter de l'activation de l'oxygène moléculaire par des ions cuivre ou fer. Il peut y avoir libération notamment du radical superoxyde O_2^{\bullet} ou du radical hydroxyle HO[•]. Les ROS sont très réactives chimiquement car elles possèdent des électrons de valence non appariés : elles peuvent dès lors réagir avec toutes les molécules rencontrées, lipides, protéines, ADN et causer des dégâts plus ou moins conséquents.

L'ubiquinone est un antioxydant très important : c'est le seul antioxydant membranaire produit directement au sein de toutes les cellules. Elle agit dans toutes les membranes de tous les tissus dans lesquels elle est présente dans des proportions 5 à 10 fois plus élevées que celles de la vitamine E (également appelé α -tocophérol, c'est un antioxydant présent dans l'alimentation). Pour être active en tant qu'antioxydant, l'ubiquinone doit être sous forme réduite ubiquinol et il s'avère que plus de la moitié du pool d'ubiquinone est sous forme réduite dans les tissus.

De nombreuses études ont montré que l'ubiquinol permet d'empêcher l'oxydation des lipides. L'oxydation des lipides est une réaction en chaîne qui est initiée par l'action d'un radical superoxyde ou hydroxyle sur un acide gras polyinsaturé d'où résulte la formation d'un radical centré sur un carbone (LH \rightarrow L[•]). Suit la phase de propagation où le radical formé réagit avec l'oxygène moléculaire en formant un radical peroxyle (LOO[•]) qui peut réagir avec un nouveau lipide et propager la réaction. Les antioxydants membranaires comme la vitamine E agissent durant cette phase de propagation en éliminant LOO[•]. La vitamine E est alors régénérée par l'action de l'ascorbate, cf. Figure 5.

L'ubiquinol agit en amont de la formation de LOO[•] en limitant la réaction dès la phase d'initiation : en effet, QH₂ peut réagir avec le radical perferryle pour former l'ubisemiquinone et H₂O₂. Il est même possible que l'ubisemiquinone réagisse avec L[•] pour former l'ubiquinone qui sera réduite par la suite sous l'action du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). L'ubiquinol est également capable de limiter la phase de propagation et est plus efficace que l'ascorbate pour régénérer la vitamine E. L'ubiquinol est donc un antioxydant particulièrement efficace en ce qui concerne les lipides.



Figure 5 : Sites d'action de l'ubiquinone sur la peroxydation des lipides. LH, acide gras polyinsaturé; L[•], radical centré sur un carbone; LOO[•], radical lipo-peroxyle; LOOH, peroxyde de lipide; HO[•], radical hydroxyle; Fe³⁺-O₂[•], radical perferryle; QH₂, ubiquinol; QH[•], ubisemiquinone; VitE-O[•], radical α -tocophérol; Asc[•], radical ascorbyle. (Adapté de Bentinger *et al.* 2007)

L'ubiquinol possède également une action antioxydante concernant les protéines et l'ADN. Il est aussi très actif dans le sang même s'il est dix fois moins présent que la vitamine E dans les lipoprotéines du sérum. En effet, son efficacité dans la régénération de la vitamine E et son mécanisme d'action en amont de la propagation des radicaux font de lui un excellent antioxydant, même en proportions réduites, d'autant plus que les mécanismes de réduction étant très efficaces dans le sang, l'ubiquinol peut facilement y être régénéré.

Le coenzyme Q est donc un antioxydant liposoluble extrêmement efficace en raison de sa présence à de fortes concentrations dans toutes les membranes plasmiques et de sa capacité à être régénéré dans sa forme active très rapidement.

I.3.c) Autres fonctions proposées (Bentinger et al. 2010)

En plus d'être un élément clef de la chaîne respiratoire et un antioxydant très efficace, l'ubiquinone participe à plusieurs autres processus biologiques.

Tour d'abord, elle intervient dans la régulation du rapport NADH/NAD⁺ dans le cytosol, dans la réduction de l'ascorbate ainsi que dans la croissance et la différentiation cellulaire en tant que cofacteur de la NADH-oxydase Q-dépendante (Gómez-Díaz *et al.* 1997).

L'ubiquinone contribue également à empêcher l'apoptose cellulaire : avec d'autres molécules, elle permet d'éviter la création de pores de transition. En effet, l'ouverture des pores de transition, qui permettent la translocation de molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 Da, peut conduire à divers évènements apoptotiques comme une chute de l'ATP, une fuite de cytochrome *c* hors de la mitochondrie, une activation de la caspase-9 (protéase à cystéine), une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une fragmentation de l'ADN. (Papucci *et al.* 2003)

L'ubiquinone est par ailleurs impliquée dans le découplement du fonctionnement de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP. En effet, les protéines découplantes, présentes à la membrane interne de la mitochondrie, ont besoin de l'assistance de l'ubiquinone pour transférer des protons (fournis par des acides gras) depuis l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale. Le gradient de protons produit par la chaîne respiratoire est alors découplé de la synthèse d'ATP et de la chaleur est produite à la place. (Echtay *et al.* 2001)

L'ubiquinone possède aussi des effets anti-inflammatoires en jouant sur l'expression du facteur de transcription NFkB1. L'incorporation d'ubiquinone dans les lymphocytes et les monocytes conduirait à la libération de médiateurs dans le sang influençant l'expression de NFkB1 dans différents tissus. (Döring *et al.* 2007)

L'ubiquinone possède en outre des propriétés anti-athérosclérotiques. En effet, elle permet de limiter la formation des plaques d'athérosclérose : elle protège les lipoprotéines de l'oxydation, empêche l'interaction des monocytes avec les cellules endothéliales et aide à contrecarrer le dysfonctionnement endothélial en stimulant la production d'oxyde nitrique. (Hamilton *et al.* 2007)

Enfin, elle régule l'oxydation des sulfures chez la levure et la formation des ponts disulfures dans les protéines bactériennes (Zhang *et al.* 2008, Inaba 2009).

L'ubiquinone, ou coenzyme Q, est donc une molécule essentielle qui intervient dans de nombreux processus biologiques : son processus de biosynthèse est donc extrêmement important.

II) Biosynthèse du coenzyme Q

Chez les eucaryotes, la biosynthèse du coenzyme Q (ou ubiquinone) se fait à partir de métabolites synthétisés dans le cytosol et également utilisés dans d'autres voies de biosynthèse : il s'agit de l'acide *para*-hydroxybenzoïque (pHB), du farnésylpyrophosphate (FPP) et de l'isopenténylpyrophosphate (IPP). Ce sont des enzymes spécifiques de la biosynthèse de l'ubiquinone qui interviennent pour assembler ces différents métabolites et former l'acide 3-polyprényl-4-hydroxybenzoïque dont elles modifient ensuite le noyau aromatique afin d'obtenir l'ubiquinone (Turunen *et al.* 2004).

Chez la levure, l'acide *para*-aminobenzoïque (pAB) peut également servir de précurseur au noyau aromatique de l'ubiquinone (Marbois *et al.* 2010, Pierrel *et al.* 2010). Par ailleurs, l'ensemble des protéines intervenant dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone sont localisées dans la mitochondrie et la majorité d'entre elles forment un complexe multiprotéique situé à la membrane interne mitochondriale (Gin *et* Clarke 2005).

Par homologie, il est suggéré que la biosynthèse de l'ubiquinone a également lieu dans la mitochondrie chez les mammifères. Cependant, certaines études tendent à montrer que l'ubiquinone peut également être produite *de novo* dans le système réticulum endoplasmique - appareil de Golgi. Elle serait alors intégrée à d'autres membranes cellulaires mais également aux lipoprotéines de faible densité libérées dans le sang par la suite (Turunen *et al.* 2004).

II.1) Biosynthèse des métabolites

II.1.a) Précurseurs du noyau aromatique

Le précurseur du noyau aromatique de l'ubiquinone chez les procaryotes et chez les eucaryotes est connu depuis les années 80 pour être l'acide *para*-hydroxybenzoïque (pHB). Chez

S. cerevisiæ, le pHB peut provenir de deux voies : il est soit synthétisé à partir du schikimate *via* le chorismate soit à partir de la tyrosine, cf. Schéma 4. La voie préférentielle est celle du chorismate : la synthèse à partir de la tyrosine ne se fait que si les voies du shikimate et du chorismate sont bloquées (Marbois *et al.* 2010). Les enzymes intervenant dans les étapes finales de la synthèse du pHB ne sont pas encore connues.

Récemment, suite à la détection d'intermédiaires aminés dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, l'acide *para*-aminobenzoïque (pAB) a été proposé comme précurseur du noyau aromatique de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* (Pierrel *et al.* 2010). Le pAB est un précurseur dont la synthèse découle également de la voie du chorismate et dont les étapes de synthèse sont connues.

Des études complémentaires, réalisées avec des composés marqués, confirment que le pAB est bien précurseur de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* mais pas chez les mammifères (souris, homme) ni chez *E. coli* (Xie *et al.* 2015). Ces études ont également permis de montrer que l'acide *para*-coumarique et le resveratrol pouvaient également être précurseurs du noyau benzénique de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ*, *E. coli*, la souris et l'homme.



Schéma 4 : Origine du noyau aromatique de l'ubiquinone chez S. cerevisiæ. Les flèches ne comportant pas de points d'interrogation désignent les étapes dont les enzymes sont connues. Les flèches en continu indiquent l'intervention d'une seule enzyme et les flèches en pointillés de plusieurs. (Adapté de Marbois et al. 2010)

II.1.b) Biosynthèse du farnésylpyrophosphate (FPP) et de l'isopenténylpyphosphate (IPP)

Le farnésylpyrophosphate (FPP) et l'isopenténylpyrophosphate (IPP) sont les briques de base de la synthèse des chaînes polyisoprénylepyrophosphates et dérivent tous les deux de la voie du mévalonate.

L'isopenténylpyrophosphate peut être isomérisé en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). L'IPP et le DMAPP sont alors condensés pour former le géranylpyrophosphate : la condensation d'un deuxième IPP permet alors l'obtention du FPP, cf. Schéma 5.



Schéma 5 : Biosynthèse du farnésylpyrophosphate (FPP) et de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) chez
 S. cerevisiæ. Chaque flèche correspond à l'intervention d'une enzyme. L'isomérisation du IPP en DMAPP et vice-versa est catalysée par la même enzyme. CoA, coenzyme A; HMG, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl; IPP, isopenténylpyrophosphate; DMAPP, diméthylallylpyrophosphate; FPP, farnésylpyrophosphate. (Bentinger et al. 2010)

II.2) Voie de la biosynthèse de l'ubiquinone

A ce jour, treize enzymes ont été identifiées comme intervenant dans la biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* : Coq1 à Coq11 ainsi que Yah1 et Arh1. Les souches de levure n'exprimant pas l'une de ces enzymes, excepté Coq10, ne produisent pas ou très peu d'ubiquinone

(Tran *et* Clarke 2007, Pierrel *et al.* 2010, Allan *et al.* 2015). Les mutants KO de Coq1 à Coq9 sont incapables de pousser sur des sources de carbone non fermentables (Tran *et* Clarke 2007).

Les enzymes Coq3 à Coq9 ainsi que Coq11 forment un complexe multiprotéique, probablement composé de sous-complexes, situé à la membrane interne mitochondriale côté matrice et indispensable à la biosynthèse de l'ubiquinone (Allan *et al.* 2015).

II.2.a) Biosynthèse de l'acide hexaprénylhydroxybenzoïque (HHB)

i) Biosynthèse de la chaîne hexaprényle : Coq1

Dans un premier temps, l'hexaprénylpyrophosphate est synthétisé à partir de farnésylpyrophosphate (FPP) et de trois isopenténylpyrophosphates (IPP) par une enzyme appartenant à la famille des *trans*-prényltransférases et spécifique de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone : Coq1. Des études de fractionnement submitochondrial ont montré que Coq1 était associée à la membrane interne de la mitochondrie, du côté de la matrice (Gin *et al.* 2005).

La longueur de la chaîne polyisoprényle de l'ubiquinone est déterminée par Coq1. En effet, une souche mutante KO complémentée par l'octaprénylpyrophosphate synthase, homologue de Coq1 chez *E. coli*, permet la synthèse d'ubiquinone avec huit unités isoprényles et non six (Okada *et al.* 1996).

L'octaprénylpyrophosphate synthase de *E. coli*, qui présente 34% d'identité de séquence avec Coq1, a récemment été cristallisée avec l'IPP (structure résolue à 2,45 Å, code PDB 3WJO) et avec un analogue sulfaté du FPP (structure résolue à 2,6 Å, code PDB 3WJN). C'est la première fois qu'une enzyme de la famille des *trans*-prényltransférases à longue chaîne est cristallisée avec des ligands. La structure obtenue a permis d'identifier deux méthionines situées en bas du tunnel du site actif et responsables de la longueur finale de la chaîne isoprényle (Han *et al.* 2014).

ii) Couplage de la chaîne hexaprényle : Coq2

Le couplage de la chaîne hexaprénylpyrophosphate et du noyau aromatique (pHB ou pAB) est réalisé par Coq2 chez *S. cerevisiæ*. Il s'agit d'une protéine transmembranaire associée à la membrane interne mitochondriale, faisant face à la matrice.

Récemment, un homologue de Coq2 chez *Aeropyrum pernix* (archée) a pu être cristallisé, il possède 20% d'identité de séquence avec Coq2. Des cristaux trempés dans un mélange de pHB, d'un analogue sulfaté non clivable du géranylpyrophosphate et d'ions Mg²⁺ ont permis d'obtenir une structure de la protéine liant ces molécules avec une résolution de3,6 Å (code PDB 40D5). Il a ainsi été possible d'émettre des hypothèses concernant le fonctionnement de la protéine, cf. Figure

6.

La chaîne grasse du polyisoprénylepyrophosphate resterait ancrée dans la membrane tandis que sa tête pyrophosphate accèderait au site actif par une ouverture latérale donnant en partie sur la bicouche lipidique. Des motifs riches en aspartates maintiendraient, *via* des ions Mg²⁺, la tête pyrophosphate en place, permettant son clivage de la chaîne grasse. Le carbocation ainsi formé serait alors couplé au pHB, maintenu dans une poche basique (Cheng *et* Li 2014).



Figure 6 : Structure de UbiA de Aeropyrum pernix, homologue de Coq2. A. Vue de profil. Domaine transmembranaire en bleu, « chapeau » en rose. B. Vue schématique de la protéine. Présence d'une grande cavité centrale munie d'une unique ouverture sur la membrane. La poche polaire de liaison pyrophosphate est représentée en rose, la zone de liaison à la chaîne polyisoprényle en gris et la poche de liaison au pHB en bleu. (Cheng *et* Li 2014)

II.2.b) Modification du noyau aromatique et mise en évidence d'un complexe multiprotéique

i) Modification du noyau aromatique

Une fois l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB) ou l'acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque (HAB) obtenus, ils sont pris en charge par un complexe multiprotéique qui modifie différentes positions du noyau aromatique afin d'aboutir à l'ubiquinone, cf. Schéma 6 et Tableau 2. Le schéma présenté est une proposition généralement admise mais peut être sujet à des modifications quant à l'ordre des étapes et l'identité chimique des substrats.



Schéma 6 : Schéma proposé de la biosynthèse de l'ubiquinone à partir de l'acide 3-hexaprényl-4hydroxybenzoïque (HHB) ou de l'acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque (HAB). HHB-OH, acide 3-hexaprényl-4,5-hydroxybenzoïque; HHB-OM acide 3-hexaprényl-4-hydroxy-5-méthoxybenzoïque; DMQ, 6déméthoxyubiquinone; QH₂, ubiquinol. (Xie *et al.* 2012)

		Famille protéique (cofacteur)	Tailla	Structure éventuelle		
	Rôle		(kDa)	Protéine	Identité avec S. cerevisiæ	Code PDB
Coq3	O-méthylation en C-5 et C-6	SAM-méthyltransférase (SAM)	33	-	-	-
Coq4	Structuration du complexe, Hydroxylation en C-1 ?	monooxygénase 2- oxoglutarate dépendante ? (Fe ^{II} ?)	36	Alr8543, Nostoc puntiform	19%	3KB4 (Forouhar <i>et al.</i> non publié)
Coq5	C-méthylation en C-2	SAM-méthyltransférase (SAM)	31	Coq5, S. cerevisiæ	100%	4OBW (Dai <i>et al.</i> 2014)
Coq6	Hydroxylation en C-5	monooxygénase à flavine (FAD)	51	Ubil, <i>E. coli</i>	28%	4N9X (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
Coq7	Hydroxylation en C-6	monooxygénase à centre di- nucléaire de fer (Fe ^{III} -Fe ^{III})	23	-	-	-
Coq8	Régulation	kinase (Mg ²⁺)	53	ADCK3, Homo sapiens	38%	4PED (Stefely <i>et al.</i> 2015)
Coq9	Nécessaire à la déamination et à l'efficacité de Coq6 et Coq7	similaire aux protéines régulatrices de la transcription	25	Coq9, Homo sapiens	18%	4RHP (Lohman <i>et al.</i> 2014)
Coq10	Chaperonne de l'ubiquinone	contient un domaine START	24	CC1736, Caulobacter crescentus	23%	1T17 (Shen <i>et al.</i> 2005)
Coq11	Décarboxylation ?	déhydrogénase/réductase à chaîne courte (FMN ?)	28	-	-	-
Arh1	Participe à l'hydroxylation en C-5	ferrédoxine réductase (FAD)	54	bAdR, <i>Bos taurus</i>	30%	1E1L (Ziegler <i>et</i> Schulz 2000)
Yah1	Participe à l'hydroxylation en C-5	ferrédoxine (centre [2Fe-2S])	12,7	Yah1, S. cerevisiæ	100%	2Y5C (Webert <i>et al.</i> 2014)

 Tableau 2 : Description des enzymes participant à la biosynthèse de l'ubiquinone, structures obtenues de la protéine de S. cerevisiæ ou d'un homologue.

 Les tailles des protéines correspondent aux tailles des protéines matures, après clivage de la séquence d'adressage à la mitochondrie.

Quatre enzymes ont un rôle connu et direct dans la modification du noyau aromatique aboutissant à la biosynthèse de l'ubiquinone. Coq3 et Coq5 sont toutes les deux des méthyltransférases utilisant la S-adénosylméthionine (SAM) comme source de méthyle. Coq3 est impliquée dans les O-méthylations en C-5 et C-6 (Shepherd *et al.* 1996, Poon *et al.* 1999) et Coq5 dans la C-méthylation en C-2 (Baba *et al.* 2004). Coq6 est décrite comme une monooxygénase à flavine impliquée dans l'hydroxylation en C-5 avec Arh1 et Yah1, une adrénodoxine réductase et une adrénodoxine (Ozeir *et al.* 2011). Coq7 est une monooxygénase à centre di-nucléaire de fer (Fe^{III}-Fe^{III}) qui participe à l'hydroxylation en C-6 (Marbois *et* Clarke 1996, Lu *et al.* 2013).

Les autres protéines Coq jouent également un rôle important dans la biosynthèse de l'ubiquinone mais leur fonction n'est pas forcément bien connue.

L'hypothèse la plus répandue concernant Coq4 est qu'elle joue un rôle structurant dans la formation du complexe multiprotéique. En effet, des interactions avec Coq3, Coq5, Coq6, Coq7 et Coq9 ont été prouvées (Allan *et al.* 2015). De plus, un homologue de Coq4 chez *Nostoc punctiform* a été cristallisé en présence de tétraprénylpyrophosphate et sa structure résolue à 2,4 Å, cf. Tableau 2 : on peut donc supposer que Coq4 de *S. cerevisiæ* est capable de lier différents intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone. Il est à noter que cette structure comporte également un ion métallique chélaté par deux histidines et un glutamate : cet ensemble est typique des monooxygénases 2-oxoglutarate dépendantes (Loenarz *et* Schofield 2008) et amène à soulever l'hypothèse que Coq4, en plus de son rôle structurant, réalise l'hydroxylation en C-1, non attribuée jusqu'à présent.

Récemment, des études sur ADCK3, un homologue humain de Coq8 (38% d'identité de séquence), ont permis de confirmer *in vitro* que ACDK3 est une kinase (Wheeler *et* Jia 2015). Des précisions sur l'action proposée de Coq8 au sein du complexe multi-protéique de biosynthèse de l'ubiquinone sont données page 26.

Une structure de l'homologue humain de Coq9 (18% d'identité de séquence) a récemment été obtenue, révélant que la protéine contenait un domaine similaire à celui des protéines régulatrices de la transcription chez les bactéries mais également un domaine de liaison aux lipides. La protéine a en outre été co-purifiée avec de l'ubiquinone (Lohman *et al.* 2014). Des études génétiques suggèrent que Coq9 serait impliquée dans la déamination en C-4 des intermédiaires aminés de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone (He *et al.* 2015).

Un mutant KO de Coq10 contient des niveaux acceptables d'ubiquinone mais sa respiration est défectueuse. Coq10 possède un domaine START (domaine similaire au domaine de liaison aux lipides présent dans les protéines de régulation rapide de la stéroïdogenèse) et qui lierait plus

spécifiquement les derniers intermédiaires de la biosynthèse de l'ubiquinone. Ces affinités spécifiques pour les intermédiaires tardifs de la biosynthèse de l'ubiquinone ont été montrées sur l'homologue de Coq10 chez *C. crescentus* (23% d'identité de séquence) en incubant la protéine avec différents molécules représentatives de plusieurs intermédiaires (ubiquinone, 6-déméthoxyubiquinone et acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque) puis en quantifiant ceux-ci en HPLC après retrait des molécules non liées. Coq10 est donc proposée comme une chaperonne de l'ubiquinone : elle faciliterait le transport et la livraison de l'ubiquinone au complexe respiratoire (Allan *et al.* 2013).

Coq11 a été découverte très récemment par Allan *et al.* (2015). Selon les auteurs, elle ferait partie de la famille des déhydrogénases/réductases à chaîne courte qui possèdent un domaine de liaison aux cofacteurs nucléotidiques comme le FAD, le FMN ou le NAD(P). Les auteurs avancent l'hypothèse que Coq11 serait une décarboxylase à FMN en faisant le parallèle avec UbiX et UbiD, enzymes à FMN, qui sont impliquées dans l'étape de décarboxylation lors de la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli.*

ii) Etudes in vitro réalisées avec des enzymes directement impliquées dans la modification du noyau aromatique

Les études menées *in vitro* sur Coq3 et Coq5, les méthyltransférases de la biosynthèse de l'ubiquinone, ont été réalisées avec des analogues de substrat synthétiques comportant trois unités isoprényles. Ces analogues ont été incubés avec de la S-adénosylméthionine (SAM) marquée et des extraits mitochondriaux de souches de levure exprimant plusieurs copies du gène d'intérêt, un contrôle étant réalisé avec des extraits mitochondriaux de souches de levure n'exprimant pas le gène d'intérêt (Poon *et al.* 1999, Baba *et al.* 2004). Les résultats obtenus sont présentés dans le Schéma 7 ci-dessous.



Schéma 7 : Méthylations réalisées par des extraits mitochondriaux de souches de levure exprimant plusieurs copies du gène codant pour Coq3 ou Coq5.
Les produits obtenus sont radioactifs, démontrant l'utilisation de la SAM pour la réalisation des méthylations. Coq3 serait donc responsable des O-méthylations en C-5 et C-6 mais sa spécificité semble assez faible vu qu'elle peut méthyler des intermédiaires comportant différents substituants en C-1.

Concernant Coq7, son homologue humain CLK-1 (40% d'identité de séquence) a pu être étudié et caractérisé *in vitro* (Lu *et al.* 2013). Une protéine de fusion a été mise au point en insérant à l'extrémité N-terminale de CLK-1 le domaine de liaison à l'immunoglobuline de la protéine G. Cette construction a permis de surexprimer la protéine chez *E. coli* et de la purifier avec son centre di-nucléaire de fer qui a été caractérisé par diverses techniques spectroscopiques.

Des tests enzymatiques ont pu être réalisés sur des analogues de substrats avec ou sans chaîne isoprényle, cf. Schéma 8. Il s'avère que CLK-1 est capable d'hydroxyler la position C-6 des deux analogues et que son efficacité catalytique est six fois plus grande lorsque l'analogue contient deux unités isoprényles.



Schéma 8 : Activité catalytique de CLK-1 *in vitro*. Efficacité catalytique de l'enzyme sur l'analogue de substrat indiquée sous la flèche de réaction.

Il est donc possible de surexprimer chez *E. coli* et d'obtenir une forme active d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone intervenant dans la modification du noyau aromatique.

iii) Composition et rôle du complexe

De nombreuses études ont été menées par le groupe de Catherine Clarke concernant la composition et la stabilité du complexe multiprotéique intervenant dans la biosynthèse de l'ubiquinone.

En produisant des souches KO de Coq3 à Coq9, il a été démontré que l'absence d'une seule de ces enzymes empêchait le complexe multiprotéique de se former et que les protéines autres que celle non exprimée volontairement avaient des taux d'expression faibles (Coq3 et Coq4) voire nuls (Coq6, Coq7 et Coq9). Les souches en question n'accumulaient que l'intermédiaire produit par Coq2, l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB). Par la suite, des expériences avec des souches mutantes KO surexprimant Coq8 (kinase) ont permis d'obtenir des complexes protéiques stables et l'accumulation d'intermédiaires de biosynthèse à des stades plus avancés. Le dernier modèle proposé pour le complexe, intégrant Coq11 dont la découverte est très récente, est présenté Figure 7 (Allan *et al.* 2015).



Figure 7 : Dernier modèle du complexe multiprotéique de biosynthèse de l'ubiquinone. (Allan et al. 2015)

González-Mariscal *et al.* ont proposé en 2014 un modèle de fonctionnement du complexe multiprotéique de bionsynthèse de l'ubiquinone, cf. Figure 8 ci-dessous. La régulation de la production d'ubiquinone se ferait notamment selon l'état de phosphorylation de Coq7, contrôlé par Ptc7 et Coq8.



Figure 8 : Modèle du fonctionnement du complexe multiprotéique de la biosynthèse de l'ubiquinone. A. Synthèse du précurseur. B. Nucléation. C. Formation du pré-complexe. D. Synthèse du DMQ par le précomplexe. E. Action de Ptc7. F. Formation du complexe complet et synthèse de l'ubiquinone. pHB, acide *para*-hydroxybenzoïque; HHB, acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DMQ, 6-déméthoxyubiquinone; Q, ubiquinone. (González-Mariscal *et al.*2014)

Ce modèle permet d'expliquer plusieurs résultats obtenus lors de la caractérisation de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone :

A. <u>Synthèse du précurseur</u>: L'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB) est produit par l'action de Coq1 et Coq2. Ces deux protéines ne sont pas présentes dans le complexe et on détecte l'accumulation de HHB lors de la phase exponentielle de croissance des levures en fermentation.

- B. <u>Nucléation :</u> Coq4 reconnaît le HHB et démarre le processus de nucléation. Il faudrait évaluer le taux d'expression de Coq4 lors de la transition diauxique (passage de la fermentation à la respiration) car on ne peut pas exclure l'activation de la nucléation par une kinase.
- C. <u>Formation du pré-complexe de 700 kDa :</u> Lors de la transition diauxique, le recrutement des protéines Coq est initié par Coq4 liée au HHB et on a formation d'un pré-complexe de 700 kDa ne comportant pas Coq7. Un tel complexe a pu être détecté par chromatographie d'exclusion stérique (Marbois *et al.* 2005)
- D. <u>Synthèse du DMQ par le pré-complexe</u>: En l'absence de Coq7, le pré-complexe accumule la 5-déméthoxyubiquinone (DMQ). La DMQ est un intermédiaire présent naturellement dans des souches sauvages de levure et fortement présent en début de transition diauxique.
- E. <u>Rôle de Ptc7 sur l'assemblage final</u>: Coq7 est déphosphorylé par Ptc7, une phosphatase, et peut être recruté par le pré-complexe.
- F. <u>Formation du complexe complet, synthèse de l'ubiquinone :</u> formation du complexe complet de biosynthèse de l'ubiquinone de 1300 kDa comportant Coq7. Un tel complexe a pu être détecté par chromatographie d'exclusion stérique (Tran *et al.* 2006).

On remarque que les auteurs proposent l'état de phosphorylation de Coq7 comme un maillon clef de la régulation de la biosynthèse de l'ubiquinone. Plusieurs découvertes confortent cette idée : l'expression d'un mutant de Coq7 ne pouvant être phosphorylé dans une souche KO Coq7 permet de multiplier le taux d'ubiquinone dans la souche par 2,5 comparé à une souche sauvage (Martín-Montalvo *et al.* 2011). Lorsque Coq7 est déphosphorylé, le complexe entier pourrait donc s'assembler et produire l'ubiquinone. La régulation de l'état de phosphorylation de Coq7 se ferait grâce à Ptc7 et Coq8. Ptc7 est une phosphatase exprimée lorsque la levure pousse sur des sources de carbone non fermentable et dans des conditions de stress oxydant : il a été montré *in vivo* et *in vitro* qu'elle pouvait déphosphoryler Coq7 (Martín-Montalvo *et al.* 2013). De même, il a été montré que Coq8 intervenait dans la phosphorylation de Coq7 (Xie *et al.* 2011).

II.3) Mutations et déficience en coenzyme Q chez l'Homme (Doimo *et al.* 2014)

L'étude de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* peut servir à mieux comprendre la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez l'homme. On trouve des homologues de Coq1 à Coq10 chez l'homme et diverses expériences de complémentation de souches KO de levure

ont montré que plusieurs protéines humaines pouvaient remplacer les protéines de levure (Tran *et* Clarke 2007).

La déficience primaire en ubiquinone est associée à des mutations ponctuelles d'enzyme intervenant directement dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone. La plupart de ces enzymes ont été identifiées par homologie avec les protéines de la voie de biosynthèse l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ.* Des phénotypes relativement divers sont associés à ces mutations : de troubles multisystémiques mortels chez les nouveau-nés à des encéphalopathies développées à l'âge adulte, cf. Tableau 3.

Gène	Homologue chez S. cerevisiæ	Symptômes	Age de développement des symptômes
PDSS1	Coq1	Léger retard mental, macrocéphalie, légère acidose lactique, neuropathie périphérique, livedo reticularis, atrophie optique, valvulopathie cardiaque	petite enfance
PDSS2	Coq1	syndrome néphrotique cortico-résistant, hypotonie, syndrome de Leigh, épilepsie, encéphalomyopathie et ataxie, surdité, dépigmentation réticulaire	néonatal à petite enfance
Coq2	Coq2	trouble multisystémique néonatal mortel, acidose lactique, syndrome de Leigh, épilepsie, cardiomyopathie hypertrophique, nystagmus, syndrome néphrotique cortico-résistant, encéphalomyopathie, épisodes ressemblant à des ictus, surdité, dépigmentation rétinienne, atrophie multisystème déclenchée à l'âge adulte	néonatal à la soixante-dizaine
Coq4	Coq4	encéphalomyopathie	néonatal
Coq6	Coq6	syndrome néphrotique cortico-résistant, surdité, épilepsie	néonatal
ADCK3	Coq8	ataxie cérébelleuse, encéphalopathie, épilepsie, dystonie, spasticité	néonatal à la vingtaine
ADCK4	Coq8	syndrome néphrotique cortico-résistant, léger retard mental	néonatal à la vingtaine
Coq9	Coq9	trouble multisystémique néonatal mortel, acidose lactique, encéphalomyopathie	néonatal

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la déficience primaire en ubiquinone.

La plupart des symptômes sont communs à ceux révélés dans les maladies liées à la déficience de la chaîne respiratoire : encéphalomyopathie, ataxie, acidose lactique, surdité neurosensorielle, dépigmentation rétinienne et cardiomyopathie hypertrophique. D'autres, comme le syndrome néphrotique cortico résistant, sont particuliers à la déficience en ubiquinone.

Dans la plupart des cas où elle est utilisée, une supplémentation orale en ubiquinone permet d'améliorer l'état de santé des patients mais elle doit se faire le plus tôt possible afin d'éviter des lésions irréversibles. Dans le cas des personnes possédant une mutation sur le gène ADCK3 (homologue de Coq8), les réponses au traitement sont beaucoup moins bonnes.

III) Coq6 de *S. cerevisiæ*, monooxygénase à flavine catalysant l'hydroxylation en C-5 de l'ubiquinone

Le gène codant pour Coq6 a été identifié comme essentiel à la biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* et ainsi nommé pour la première fois par Tzagoloff *et* Dieckman en 1990. En 1997, Poon *et al.* ont confirmé l'intervention de Coq6 dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone en montrant qu'un mutant KO de Coq6 n'est pas capable de synthétiser de l'ubiquinone et accumule l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB).

III.1) Une monooxygénase à flavine de classe A

C'est en 2000 que Kwon *et al.* ont constaté que Coq6 possédait une forte identité de séquence avec UbiF (24%) et UbiH (27%), deux monooxygénases de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone.

En réalisant des alignements de séquence de Coq6 avec des monooxygénases à flavine comme la *para*-hydroxybenzoate hydroxylase (pHBH), Gin *et al.* (2003) ont montré que Coq6 possédait des motifs de liaison au FAD caractéristiques des monooxygénases à flavine (GxGxxG, DG, GD). Elle ferait donc partie d'une famille de monooxygénases à flavine que Van Berkel *et al.* ont proposé de désigner par « monooxygénases à flavine de classe A » en 2006.

III.1.a) Généralités sur les monooxygénases à flavine

Les monooxygénases à flavine, avec les oxydases à flavine, font partie de la grande famille des flavoprotéines activant l'oxygène moléculaire, cf. Schéma 9.

- (1) $E-FI + NAD(P)H + H^+ \rightleftharpoons E-FIH_2 + NAD(P)^+$ (1) $E-FI + SH_2 \rightleftharpoons E-FIH_2 + S$
- (2) $\text{E-FIH}_2 + \mathbf{S} + \mathbf{O}_2 \rightleftharpoons \text{E-FI} + \mathbf{SO} + \text{H}_2\text{O}$ (2) $\text{E-FIH}_2 + \mathbf{O}_2 \rightleftharpoons \text{E-FI} + \text{H}_2\text{O}_2$

Oxydases

Monoxygénases ou hydroxylases

Schéma 9 : Schéma simplifié du fonctionnement des flavoprotéines activant l'oxygène moléculaire. E : enzyme, Fl : flavine, S : substrat.

Les monooxygénases à flavine sont des enzymes liant le FMN (Flavine MonoNucléotide) ou le FAD (Flavine Adénosine Dinucléotide), cf. Figure 9. Cette liaison peut être forte et dans ce cas la flavine est un cofacteur. La liaison peut aussi se produire de façon transitoire lors de la catalyse : dans ce cas la flavine est un substrat.

La partie réactive du FMN et du FAD est le noyau isoalloxazine qui peut être réduit à un électron pour former la flavine semiquinone, ou à deux électrons pour former la flavine réduite. Ces espèces peuvent exister sous différentes formes de protonation et ont des signatures en spectroscopie d'absorption UV-visible caractéristiques, cf. Figure 9. Lors de la catalyse de l'hydroxylation d'un substrat par une monooxygénase à flavine, des intermédiaires hydroperoxyflavine et hydroxyflavine se forment : ils possèdent également des signatures en spectroscopie d'absorption UV-visible caractéristiques, cf. Figure 9.



Figure 9 : Structures et signatures en spectroscopie d'absorption UV-visible de la flavine, de ses états rédox et de ses adduits avec l'oxygène. Structures du NADPH, du NADH, du NADP⁺ et du NAD⁺. Flavine oxydée en noir, flavine réduite en petits pointillés, semiquinone rouge en rouge, semiquinone bleue en bleu, hydroperoxyflavine en gris, hydroxyflavine en grands pointillés. (Crozier-Reabes *et* **Moran 2012).**

Van Berkel *et al.* (2006) ont proposé une classification des monooxygénases à flavine en six classes que l'on peut répartir en deux groupes : un groupe comportant les monooxygénases à flavine à un composant (classes A et B) et un groupe comportant les monooxygénases à deux composants (classes C à F). Des exemples de protéines appartenant à chacune de ces classes, associées à leur substrat et au produit de l'hydroxylation, sont présentés en Annexe, Figure S1 page 189.

Les monooxygénases à un composant possèdent une grande affinité pour leur cofacteur flavinique. Celui-ci est, en théorie, réduit par l'action directe du NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) ou du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), cf. Schéma 9 et Schéma 10. L'oxygène moléculaire réagit avec la flavine réduite pour former l'hydroperoxyde de flavine qui réalisera l'hydroxylation. Les monooxygénases de classe A comportent un motif de liaison à un dinucléotide qui lie le FAD (appelé Rossman fold) alors que les monooxygénases de classe B possèdent deux Rossman fold : un pour le FAD et l'autre pour le NADPH.

Les monooxygénases à deux composants ne lient la flavine que lors de la catalyse. Afin de réaliser l'oxydation de son substrat, l'enzyme reçoit la flavine réduite d'une flavine réductase dont les électrons proviennent du NADH ou du NADPH, cf. Schéma 10. Les mécanismes enzymatiques proposés pour les classes A à F sont présentés en Annexe, Figure S2 page 190.







Schéma 10 : Schéma général du fonctionnement des monooxygénases à flavine à un et deux composant(s). Le rectangle représente la monooxygénase.

Plus récemment, l'ajout d'un nouveau groupe comportant deux classes (G et H) a été proposé : le cofacteur flavinique de ces monooxygénases est réduit par l'action du substrat et non d'un donneur d'électrons externe tel le NADPH ou le NADH. Ces enzymes catalysent des réactions de décarboxylation ou dénitration oxydatives (Huijbers *et al.* 2014).

III.1.b) Mécanisme enzymatique, exemple de PHBH

La *para*-hydroxybenzoate hydroxylase (pHBH) est considérée comme l'exemple canonique des monooxygénases à flavine de classe A. Elle a été caractérisée d'un point de vue enzymatique ainsi que structurellement avec son cofacteur FAD et son substrat (Howell *et al.* 1972, Schreudeur *et al.* 1989, Entsch *et* Van Berkel 1995). Des exemples de structures obtenues par diffraction aux rayons X de plusieurs protéines de la classe A des monooxygénases à flavine sont présentés en Annexe, Figure S3 page 191.

Le mécanisme de la pHBH a été étudié en détail par différentes techniques spectroscopiques et il est désormais assez bien connu, cf. Schéma 11.



Schéma 11 : Mécanisme enzymatique de pHBH. Adapté de Crozier-Reabes et Moran 2012.

Dans un premier temps, la protéine lie l'acide *para*-hydroxybenzoïque (pHB). Ensuite, le NADPH (forme réduite) peut se lier et transférer un hydrure (H⁻) au FAD (forme oxydée): celui-ci est alors réduit (FADH₂).

La réduction de la flavine entraîne un changement de conformation de la protéine qui libère le NADP⁺ (forme oxydée). Le FAD réduit (FADH₂) peut alors activer l'oxygène moléculaire : l'hydroperoxyde de flavine (FAD-OOH) est formé. Il s'agit de l'espèce réactive qui va permettre d'hydroxyler le pHB.

Une diénone non aromatique se forme alors de façon transitoire avant de retrouver rapidement son aromaticité suite à un réarrangement qui va également protoner l'hydroxyflavine (FAD-OH). Un faisceau de constatations tend à prouver que, par la suite, le produit de l'hydroxylation est libéré avant la déshydratation de l'hydroxyflavine. Suite à cette déshydratation, le FAD retrouve son état initial et un nouveau cycle catalytique peut se produire (Crozier-Reabes *et* Moran 2012).

III.2) Hydroxylation en C-5 et substrat de Coq6

III.2.a) Preuve de l'implication de Coq6 dans l'hydroxylation en C-5

Un mutant KO de Coq6, comme les mutants KO de Coq3, Coq5 et Coq7, n'est pas capable de synthétiser de l'ubiquinone et accumule l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB), un des premiers intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone (Poon *et al.* 1997). L'accumulation d'un tel intermédiaire s'explique par le fait que l'absence d'une de ces enzymes conduit à une déstabilisation du complexe multiprotéique responsable de la biosynthèse de l'ubiquinone (Gin *et* Clarke 2005). L'étude d'un mutant KO de Coq6 ne permet donc pas, dans ces conditions, de déterminer la position qu'hydroxyle Coq6 sur le noyau aromatique de l'ubiquinone.

La découverte de la stabilisation du complexe de biosynthèse de l'ubiquinone chez la levure par la surexpression de la kinase Coq8 a permis de produire des mutants KO possédant une forme stable du complexe multiprotéique (Padilla *et al.* 2009, Ozeir *et al.* 2011, Xie *et al.* 2012). Il a donc été possible de détecter l'accumulation d'intermédiaires plus tardifs que l'acide 3-hexaprényl-4hydroxybenzoïque dans ces mutants.

En 2011, l'étude d'un mutant KO de Coq6 surexprimant Coq8 par Ozeir *et al.* a permis d'isoler deux nouveaux intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, selon que le noyau aromatique de départ était l'acide *para*-hydroxybenzoïque (pHB) ou l'acide *para*-aminobenzoïque (pAB) : il s'agit respectivement de l'hexaprényl-hydroquinone (HHQ) et du 3-hexaprényl-4-aminophénol (HAP), cf. Schéma 12.



Schéma 12 : Intermédiaires accumulés dans une souche KO Coq6 surexprimant Coq8. pHB, acide parahydroxybenzoïque; pAB acide para-aminobenzoïque; HHQ, hexaprényl-hydroquinone; HAP, 3-hexaprényl-4aminophénol.

On constate que les hydroxyles en C-5 et en C-6 sont absents tandis que l'hydroxyle en C-1 est présent sur HHQ et HAP. Sachant que l'hydroxylation en C-6 est attribuée à Coq7 et la position

C-1 étant hydroxylée, on peut donc conclure à une implication de Coq6 dans l'hydroxylation en C-5. Par ailleurs, on peut proposer le HHQ (et le HAP) comme des substrats potentiels de Coq6.

III.2.b) Identité chimique du substrat de Coq6

Si on considère le schéma de la biosynthèse de l'ubiquinone généralement admis, cf. Schéma 6, et les résultats des expériences menées sur le mutant KO de Coq6 surexprimant Coq8, cf. Schéma 12, on constate que le substrat proposé pour Coq6 diffère au niveau du groupement chimique présent en C-1. Dans le cas du schéma généralement admis, il s'agirait d'un carboxyle et d'après les expériences de Ozeir *et al.* il s'agirait d'un hydroxyle.

Des études réalisées sur des souches de levure mutées incapables de synthétiser l'ubiquinone ont permis de détecter des intermédiaires de biosynthèse tels que l'acide 3hexaprényl-4,5-hydroxybenzoïque (HHB-OH) et l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxy-5-méthoxybenzoïque (HHB-OM), cf. Schéma 6, (Goewert *et al.* 1981a et b). L'accumulation de ces intermédiaires suggèrerait que l'hydroxylation en C-5 est réalisée avant la décarboxylation et l'hydroxylation en C-1. L'hydroxyle en C-5 serait alors nécessaire pour que les étapes de décarboxylation et d'hydroxylation en C-1 puissent être réalisées.

Les résultats obtenus par Ozeir *et al.* suggèreraient quant à eux que la décarboxylation et l'hydroxylation en C-1 peuvent se faire sans que l'hydroxyle en C-5 soit présent.

Ces expériences soulèvent donc la question de l'ordre d'intervention et de la spécificité des enzymes modifiant la position C-1 et la position C-5. La décarboxylase et l'hydroxylase en C-1 n'étant pas connues avec certitude et aucune étude *in vitro* n'existant à ce jour concernant Coq6, on peut poser la question de l'identité chimique du groupement présent en C-1 sur le substrat de Coq6 et envisager au moins trois substrats selon l'ordre des différentes réactions, cf. Schéma 13.



Schéma 13 : Substrats proposés pour Coq6. HHB, acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; HHQ, hexaprényl-hydroquinone; HPol, 2-hexaprénylphénol.

Il est tout à fait possible que Coq6 ne soit pas une enzyme très spécifique et qu'elle puisse participer à l'étape d'hydroxylation en C-5 des trois substrats proposés.

De façon intéressante, des études *in vivo* très récentes tendent à prouver que, en plus de la réaction d'hydroxylation en C-5, Coq6 catalyse la réaction de déamination en C-4, remplaçant

l'amine par un hydroxyle (Ozeir *et al.* non publié). La présence de Coq9, qui interagirait avec Coq6, serait également nécessaire à la réalisation de cette étape. Par ailleurs, cette déamination serait essentielle pour que Coq7 reconnaisse son substrat et que la synthèse de l'ubiquinone soit complète, Coq7 n'étant pas capable d'hydroxyler un composé aminé.

III.3) Une source d'électrons atypique : l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine

III.3.a) Preuves in vivo

Des résultats d'études *in vivo* menées par nos collaborateurs (Pierrel *et al.* 2010, Ozeir *et al.* 2011) montrent qu'une souche de *S. cerevisiæ* mutante n'exprimant pas l'adrénodoxine réductase ou de l'adrénodoxine présente le même phénotype qu'une souche mutante KO Coq6 surexprimant Coq8, c'est-à-dire l'accumulation d'hexaprénylhydroquinone (HHQ) ou de 3-hexaprényl-4-aminophénol (HAP), selon que le noyau aromatique de départ était l'acide *para*-hydroxybenzoïque (pHB) ou l'acide *para*-aminobenzoïque (pAB), cf. Schéma 12.

L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats est que Coq6 ne se comporterait pas comme une monooxygénase de classe A classique : une chaîne de transfert d'électrons comprenant Arh1 et Yah1 serait nécessaire pour que les électrons du NAD(P)H soient transférés à Coq6 afin qu'elle puisse réaliser l'hydroxylation en C-5.

III.3.b) Adrénodoxine réductase et adrénodoxine

Les adrénodoxines réductases et les adrénodoxines sont des protéines répandues chez les eucaryotes qui participent à plusieurs processus biologiques. Les adrénodoxines réductases sont des flavoprotéines à FAD faisant partie de la famille des ferrédoxines NADP⁺ réductases (FNR). Les adrénodoxines, quant à elles, sont des protéines à centre [2Fe-2S].

i) Généralités sur les ferrédoxines NADP⁺ *réductases (FNR)*

Les FNR comportent généralement deux domaines : un domaine de liaison au FAD et un domaine de liaison au NAD(P)H.

La FNR de plante transfère les électrons depuis la ferrédoxine (protéine à centre Fe-S) réduite par le photosystème I jusqu'au NADP⁺ qui est réduit en NADPH. Le NADPH est ensuite utilisé dans le processus d'assimilation du CO₂ (Medina 2009). La structure de la ferrédoxine NADP⁺ réductase d'épinard résolue à 1,7 Å est présentée Figure 10 (Bruns *et* Karplus 1995).

Les FNR peuvent également transférer les électrons dans le sens inverse, depuis le NADPH jusqu'aux ferrédoxines ou d'autres protéines nécessitant des électrons : on peut citer l'exemple de

la méthionine synthase réductase impliquée dans la synthèse de la méthionine (Wolthers *et* Scrutton 2007).



Figure 10 : Structure de ferrédoxine NADP⁺ réductase d'épinard, code PDB 1FNB. En jaune, le FAD.

ii) Généralités sur les protéines à centre Fe-S (Lill 2009)

Les protéines à centre Fe-S, de par leurs propriétés rédox, sont impliquées dans de nombreux processus biologiques.

Elles sont capables de catalyser de nombreuses réactions : on peut citer l'exemple classique de l'aconitase à centre [4Fe-4S] qui permet la déshydratation du citrate en isocitrate ou encore de la biotine synthase, une enzyme à radical S-adénosyl-L-méthionine, qui contient deux types de centres Fe-S ([4Fe-4S] et [2Fe-2S]) et catalyse l'incorporation de l'atome de soufre de la biotine.

Les protéines à centre Fe-S sont également capables d'agir comme senseurs pour la régulation de l'expression des gènes. Chez les bactéries on trouve les facteurs de transcription FNR, IScR et SoxR qui permettent de détecter, respectivement, la présence d'oxygène moléculaire, de centres Fe-S et de superoxyde/NO. Chez les mammifères, l'aconitase agit également comme régulatrice du taux de fer intracellulaire.

La principale fonction des protéines à centre Fe-S reste la participation au transfert d'électrons dans de nombreux processus biologiques : elles interviennent par exemple dans les complexes I et III des chaînes respiratoires bactérienne et mitochondriale ou encore dans le photosystème I.

iii) Fonctions connues de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine

Chez les mammifères, l'adrénodoxine réductase peut transférer les électrons du NADPH à deux adrénodoxines différentes : Fdx1 et Fdx2. Dans les glandes surrénales, Fdx1 intervient dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes en transférant ses électrons aux cytochromes P450 mitochondriaux (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2). Fdx2, quant à elle, est ubiquitaire et intervient dans la synthèse de l'hème A et des centres Fe-S (Sheftel *et al* 2010).

Depuis les années 70, de nombreuses études ont été réalisées sur l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine isolées des glandes surrénales de bœuf. Elles forment un complexe 1 : 1 avec une constante de dissociation très faible de l'ordre du nanomolaire (Chu et Kimura 1973b). Ce complexe a été cristallisé en présence du FAD de l'adrénodoxine réductase et du centre [2Fe-2S] de l'adrénodoxine en 2001 par Müller *et al.* : une structure avec une résolution de 2,3 Å a été obtenue, cf. Figure 11. Ce complexe transfère les électrons depuis le NADPH jusqu'aux cytochromes P450.



Figure 11 : Structure cristallographique résolue à 2,3 Å du complexe AdR (bleue)-Adx (rouge) de bœuf (code PDB 1E6E). Le FAD de bAdR est en jaune et le centre [2Fe-2S] de bAdx en jaune (soufre) et orange (fer).

L'adrénodoxine réductase de *S. cerevisiæ* a été décrite pour la première fois par Manzella *et al.* en 1998 et désignée par Arh1 (dans un souci de clarté, elle sera désignée par ScAdR dans la suite du manuscrit). L'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*, quant à elle, a été décrite pour la première fois par Barros *et* Nobrega en 1999 et désignée par Yah1 (dans un souci de clarté, elle sera désignée par ScAdx dans la suite du manuscrit). Ces deux protéines sont mitochondriales.

S. cerevisiæ ne possédant pas de cytochrome P450, la question du rôle de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine chez la levure s'est posée, d'autant plus que leur délétion affecte des fonctions essentielles de la levure. L'hypothèse émise était qu'elles constituaient une chaîne de transfert d'électrons cruciale pour la levure.

Par la suite, des études ont montré que l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine étaient essentielles pour la régulation du taux de fer cellulaire et mitochondrial ainsi que pour le fonctionnement des protéines à centre Fe-S (Lange *et al.* 2000, Li *et al.* 2001).

L'implication directe de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine dans la biosynthèse des protéines à centre Fe-S a été prouvée en 2014 par Webert *et al.* En effet, l'homologue humain de l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* permettent la formation *in vitro* d'un centre [2Fe-2S] dans Isu1 de *S. cerevisiæ*, qui est une protéine matrice des centres [2Fe-2S].

Des études *in vivo* tendent à montrer que l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine participeraient également à la synthèse de l'hème A en transférant des électrons depuis le NADPH jusqu'à Cox15, qui hydroxylerait alors l'hème O en hème A (Barros *et al.* 2002).

IV) Objectifs de la thèse

- Obtention pour la première fois d'un outil pour l'étude in vitro d'une monooxygénase à flavine de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone :
 - Surexpression chez *E. coli* de Coq6, de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine, trois enzymes impliquées dans l'hydroxylation en C-5 chez *S. cerevisiæ*;
 - Purification de formes actives de Coq6, de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine;
 - Synthèse d'analogues de substrat dans le but d'identifier le substrat de Coq6 qui n'est pas connu avec certitude ;
 - Etude mécanistique du transfert d'électrons du NAD(P)H à Coq6 dans lequel, de façon inhabituelle, l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine seraient impliquées.
- Etude structurale de Coq6 dans le but d'obtenir la première structure avec cofacteur d'une monooxygénase à flavine de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

I) Matériel biologique

I.1) Souches bactériennes

Nom	Génotype	Fonction	
<i>E. coli</i> DH5α ¹	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K .m _K .), λ-	Souche permettant d'obtenir de nombreuses copies de plasmide, utilisée pour obtenir les stocks d'ADN plasmidique.	
<i>E. coli</i> BL21(DE3) ¹	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B -m _B -) gal λ(DE3)	Souche permettant le contrôle de la surexpression des protéines dont le gène a été cloné en aval du promoteur T7, induit par la T7 ARN polymérase. Le phage DE3 présent dans la souche contient le gène codant pour la T7 ARN polymérase sous contrôle du promoteur <i>LacUV5</i> inductible par l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) : ce n'est qu'à l'ajout d'IPTG que la T7 ARN polymérase, et par conséquent la protéine d'intérêt, vont être surexprimées.	
<i>E. coli</i> BL21 CodonPlus(DE3)- RIL ¹	F- ompT hsdS(r _B -m _B -) dcm + Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Souche permettant la surexpression de protéines hétérologues : elle contient plusieurs copies de gènes codant pour trois ARNt rares chez <i>E. coli</i>	
<i>E. Coli</i> RosettaBlue™ (DE3)pLysS ²	endA1 $hsdR17(r_{K12} m_{K12})$ supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (DE3) [F' proA+B+ lacl qZ Δ M15 ::Tn10] pLysSRARE2 [argU argW argX ileX glyT proL metT thrT tyrU thrU leuW] (Cam ^R , Tet ^R)	Souches permettant la surexpression de protéines hétérologues : elles contiennent plusieurs copies de gènes codant pour sept ARNt rares chez <i>E. coli.</i> La présence du plasmide pLysS permet de réprimer l'expression basale de la T7 ARN polymérase : il permet de produire le lysozyme T7 qui va inhiber la T7 ARN polymérase. Ainsi, tant que l'IPTG n'est pas ajouté, la T7 ARN polymérase n'est pas surexprimée ni, par conséquent, la protéine d'intérêt. Cela permet de limiter l'éventuel pouvoir toxique de la protéine tant que l'induction n'est pas faite. La souche Rosetta-gami [™] 2 permet de favoriser la formation de ponts disulfures grâce à des mutations sur les gènes codant pour la thiorédoxine réductase (<i>trxB</i>) et la glutathion réductase (<i>gor</i>).	
<i>E. Coli</i> Rosetta™2 (DE3)pLysS ²	F ⁻ ompT hsdSB(r _B ⁻ m _B) gal dcm (DE3) pLysSpRARE2 [argU argW argX ileX glyT proL metT thrT tyrU thrU leuW] (Cam ^R)		

 Tableau 4 : souches bactériennes utilisées.
 Sources : 1) Agilent Technologies, 2) Novagen.

I.2) Vecteurs plasmidiques

Nom	Caractéristiques	Origine
pGro7	Plasmide permettant de surexprimer les	TaKaRa Bio, Inc.
	chaperonnes GroES et GroEL. Les gènes codant	(Japan)
	pour ces protéines sont en aval du promoteur	
	araB, inductible par le L-arabinose. Gène de	
	résistance au chloramphénicol.	
pMALc2x-levCoq6	Plasmide permettant la surexpression d'une	Réalisé par N.
	protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ	Labessan à partir
	en aval d'un promoteur fort <i>, tɑc,</i> inductible par	d'un vecteur pMAL-
	l'IPTG. Le gène de Coq6 de <i>S. cerevisiæ</i> est	c2x (New England
	inséré en aval du gène codant pour la MBP	Biolabs)
	(Maltose Binding Protein). Une séquence	
	codant pour un linker clivable par le facteur Xa	
	est présente entre les deux génes. L'ensemble	
	de la sequence a ete optimisee par une	
	modification des codons pour une	
	surexpression chez <i>E. coll.</i> Gene de resistance a	
nNAALogy A1 24louCoge	Lampicilline.	Déalicé nar M
piviALC2X-D1-24ievC0q6	Plasifilde semblable a piviALC2X-levCode	Realise par IVI. Smadia à partir do
	les 24 promiers asides aminés de Cogé de	
	<i>S. cerevisiæ.</i>	
pETDuet-1-hAdR	Plasmide permettant la surexpression de	U. Mühlenhoff
	l'adrénodoxine réductase humaine avec un tag	(Sheftel <i>et al.</i> 2010)
	de six histidines à son extrémité N-terminale.	
	La séquence est intégrée en aval d'un	
	promoteur T7. Gène de résistance à	
	l'ampicilline.	
pET15b-ScAdx	Plasmide permettant la surexpression de	U. Mühlenhoff
	l'adrénodoxine de levure en aval d'un	(Sheftel <i>et al.</i> 2010)
	promoteur T7. Gène de résistance à	
	l'ampicilline.	

Tableau 5 : Vecteurs plasmidiques utilisés.

pMALc2x-levCoq6 : Coq6 de S. cerevisiæ entier

GATTTAAAGACAACTTTAGTCGATATGGTGGACTTAAAAGATAAATTATCGGACTTTTATAATTCACCGCCAGATTATTTTACGAACCG CATTGTCAGTGTTACGCCTCGCTCTATTCATTTTCTTGAGAATAACGCTGGGGCAACTTTGATGCATGACCGCATTCAAAGTTATGACG GACTCTATGTCACGGACGGTTGTTCTAAGGCTACTTTGGATCTGGCACGCGACTCCATGCTTTGTATGATAGAATTATTAATATTCAG GCCTCCTTATACAACCGCATTTCTCAGTACGATTCAAAGAAGGACTCCATTGATATTATTGATAATACAAAAGTTGTCAATATTAAACA CAGCGACCCTAATGATCCATTGTCCTGGCCTTTAGTCACTCTTTCCAATGGTGAAGTATACAAGACGCGCTTGTTAGTGGGGGGCAGAGCG GGTTCAATTCTCCTACCCGCCGCTTTTCCCAGATCCCATCTGCGGGGCTGGATGTATAATGCCAAGGTGTGTGGGGCAGCAGCAGCAG GGTTCAATTCTCCTACCCGCCGCTTTTCCCAGATCCCATCTGCGGGCTGGATGTATAATGCCTATGGTGTTGTGGCCAGCATGAAGTTA GAGTATCCTCCGGTTTAAATTACGTGGCTGGCAGCGTTTCTTACCGACGGCTCGATGATCACTTCACTGCACTTATCAATGCTGCTTTTG TCTTGGAAGACGCAGACATGAACTACTATTACCGTACATTGGAAGATGGCTCTATGGACACCGATAAATTGATGAAGATATTAAATTC CGCACTGAGGAAATTTACGCCACGTTGAAGGACGAGTCGGATATTGATGACGCTTATGGACACCGCGTTGTTAGTATTATCGAAAATTAACACATGCAGACGCAGACGTTCATGGCGCTTTAGGACACGCGTTGTTAGTATACGACAAGAC ACCCTCCCGCTGGACAGGGGTTAAACATGGGGCAAACAGACGTTCATGGCTTAAGAACGCTTTTAGGAAAAGGCAATGGAACGCGGTTTA GACATTGGCTCTTCATTGAGCCTTAGGACCGTTTTGGGCAGAACGTTATCCGTCGAACAACGTTTTATTAGGAATAGGCGGATAAATTATT TAAATTATATCACACTAATTTTCCCTCCTGTGGTGGCACACGCACTTTCGGTTGAGCACAAGACCGGTTTAAGAATATT TAAATTATATCACACTAATTAACACCGTTTTGGGCAGAACGTTATTGGCTTTGGACGAATAAGATCGGTCCAGTTAAGAAT TGATCATTGACACATTAGGAGAAATGAGAAATAAAAGCTGGCCAC

MKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYA QSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKG SLMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAF NKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEG LEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEAL KDAQTNSSSNNNNNNNNLGIEGRISEFGSFFSKVMLTRRILVRGLATAKSSAPKLTDVLIVGGGPAGLTL AASIKNSPQLKDLKTTLVDMVDLKDKLSDFYNSPPDYFTNRIVSVTPRSIHFLENNAGATLMHDRIQSYDGL YVTDGCSKATLDLARDSMLCMIEIINIQASLYNRISQYDSKKDSIDIIDNTKVVNIKHSDPNDPLSWPLVTL SNGEVYKTRLLVGADGFNSPTRRFSQIPSRGWMYNAYGVVASMKLEYPPFKLRGWQRFLPTGPIAHLPMPEN NATLVWSSSERLSRLLLSLPPESFTALINAAFVLEDADMNYYRTLEDGSMDTDKLIEDIKFRTEEIYATLK DESDIDEIYPPRVVSIIDKTRARFPLKLTHADRYCTDRVALVGDAAHTTHPLAGQGLNMGQTDVHGLVYALE KAMERGLDIGSSLSLEPFWAERYPSNNVLLGMADKLFKLYHTNFPPVVALRTFGLNLTNKIGPVKNMIIDTL GGNEK

pMALc2x-Δ1-24levCoq6 : Coq6 de S. cerevisiæ tronquée

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGCCGATGGCCCTGACA TTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAG ${\tt CTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAA$ CAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCCGCTGA TGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAAACGGCAAGTACGAC CACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACA AACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACTATCTGCTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGA CAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCCAGA AAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTCGTCAG ACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAACAACAATAACAACAACAACCACCTCGGGATCGAGGG AAGGATTTCAGAATTCGGATCCCCCAAAGTTAACAGATGTATTAATCGTAGGTGGGGGGTCCTGCAGGTTTGACTTTAGCTGCATCGATTA AGAATTCTCCGCAATTAAAAGATTTAAAGACAACTTTAGTCGATATGGTGGACTTAAAAGATAAATTATCGGACTTTTATAATTCACCG ${\tt CCAGATTATTTTACGAACCGCATTGTCAGTGTTACGCCTCGCTCTATTCATTTCTTGAGAATAACGCTGGGGCAACTTTGATGCATGA$ TTGAAATTATTAATATTCAGGCCTCCTTATACAACCGCATTTCTCAGTACGATTCAAAGAAGGACTCCATTGATATTATTGATAATACA AAAGTTGTCAATATTAAACACAGCGACCCTAATGATCCATTGTCCTGGCCTTTAGTCACTCTTTCCAATGGTGAAGTATACAAGACGCG ATGCCTGAAAATAATGCTACTTTAGTCTGGAGTTCATCTGAACGTTTATCGCGCCCTTTTGTTGTCATTACCTCCAGAATCATTCACTGC ACTTATCAATGCTGCTTTTGTCTTGGAAGACGCAGACATGAACTACTATTACCGTACATTGGAAGATGGCTCTATGGACACCGATAAAT TGATTGAAGATATTAAATTCCGCACTGAGGAAATTTACGCCACGTTGAAGGACGAGTCGGATATTGATGAAAATTTACCCACCACGCGTT GTTAGTATTATCGATAAGACACGCGCACGTTTTCCGTTAAAATTAACACATGCAGATCGTTATTGCACTGATCGCGTTGCCCTTGTTGG GGACGCAGCACATACGACACATCCTCTCGCTGGACAGGGGTTAAACATGGGGCAAACAGACGTTCATGGTTTAGTATACGCTTTAGAAA ${\tt AGGCAATGGAACGCGGTTTAGACATTGGCTCTTCATTGAGCTTAGAACCGTTTTGGGCAGAACGTTATCCGTCGAACAACGTTTTATTA$ GGAATGGCGGATAAATTATTTAAATTATTATCACACTAATTTTCCTCCTGTGGTAGCCTTACGCACTTTTGGTTTGAATCTGACGAATAA GATCGGTCCAGTTAAGAATATGATCATTGACACATTAGGAGGAAATGAGAAATGA

MKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQ SGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFN KGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLE AVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDA QTNSSSNNNNNNNNNLGIEGRISEFGSPKLTDVLIVGGGPAGLTLAASIKNSPQLKDLKTTLVDMVDLKDKL SDFYNSPPDYFTNRIVSVTPRSIHFLENNAGATLMHDRIQSYDGLYVTDGCSKATLDLARDSMLCMIEIINIQ ASLYNRISQYDSKKDSIDIIDNTKVVNIKHSDPNDPLSWPLVTLSNGEVYKTRLLVGADGFNSPTRFSQIPS RGWMYNAYGVVASMKLEYPPFKLRGWQRFLPTGPIAHLPMPENNATLVWSSSERLSRLLLSLPPESFTALINA AFVLEDADMNYYYRTLEDGSMDTDKLIEDIKFRTEEIYATLKDESDIDEIYPPRVVSIIDKTRARFPLKLTHA DRYCTDRVALVGDAAHTTHPLAGQGLNMGQTDVHGLVYALEKAMERGLDIGSSLSLEPFWAERYPSNNVLLGM ADKLFKLYHTNFPPVVALRTFGLNLTNKIGPVKNMIIDTLGGNEK

pMALX(E)-levCoq6 : Coq6 de S. cerevisiæ et MBP optimisée

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACA TTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGCCGCAGCGTTCCAGGACAAG ${\tt CTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAA$ CAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGATCCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGA TGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGCAGCCGGCAAGTACGAC CACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACA AACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACTATCTGCTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGA ${\tt CAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCCAGA$ AAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTCGTCAG GCGCGGTTTGGCAACAGCCAAATCTTCAGCTCCAAAGTTAACAGATGTATTAATCGTAGGTGGGGGGTCCTGCAGGTTTGACTTTAGCTG CATCGATTAAGAATTCTCCGCAATTAAAAGATTTAAAGACAACTTTAGTCGATATGGTGGACTTAAAAGATAAATTATCGGACTTTTAT AATTCACCGCCAGATTATTTTACGAACCGCATTGTCAGTGTTACGCCTCGCTCTATTCATTTTCTTGAGAATAACGCTGGGGCAACTTT TTTGTATGATTGAAATTATTAATATTCAGGCCTCCTTATACAACCGCATTTCTCAGTACGATTCAAAGAAGGACTCCATTGATATTATT GATAATACAAAAGTTGTCAATATTAAACACAGCGACCCTAATGATCCATTGTCCTGGCCTTTAGTCACTCTTTCCAATGGTGAAGTATA CAAGACGCGCTTGTTAGTGGGTGCAGACGGGTTCAATTCTCCTACCCGCCGCTTTTCCCAGATCCCATCTCGCGGCTGGATGTATAATG ATTCACTGCACTTATCAATGCTGCTTTTGTCTTGGAAGACGCAGACATGAACTACTACTATCACCGTACATTGGAAGATGGCTCTATGGAACA ${\tt CCGATAAATTGAAGATATTAAATTCCGCACTGAGGAAATTTACGCCACGTTGAAGGACGAGTCGGATATTGATGAAATTTACCCA}$ ${\tt CCACGCGTTGTTAGTATTATCGATAAGACACGCGCCACGTTTTCCGTTAAAATTAACACATGCAGATCGTTATTGCACTGATCGCGTTGC$ ${\tt CCTTGTTGGGGACGCAGCACATACGACACATCCTCTCGCTGGACAGGGGGTTAAACATGGGGCAAACAGACGTTCATGGTTTAGTATACG$ ${\tt CTTTAGAAAAGGCAATGGAACGCGGTTTAGACATTGGCTCTTCATTGAGCTTAGAACCGTTTTGGGCAGAACGTTATCCGTCGAACAAC$ GTTTTATTAGGAATGGCGGATAAATTATTTAAATTATATCACACTAATTTTCCTCCTGTGGTAGCCTTACGCACTTTTGGTTTGAATCT GACGAATAAGATCGGTCCAGTTAAGAATATGATCATTGACACATTAGGAGGAAATGAGAAATAA

MKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQ SGLLAEITPAAAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYAAGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFN KGETAMTINGPWAWSNIDTSAVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLE AVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDAALAAA QTNAAAASFFSKVMLTRRILVRGLATAKSSAPKLTDVLIVGGGPAGLTLAASIKNSPQLKDLKTTLVDMVDLK DKLSDFYNSPPDYFTNRIVSVTPRSIHFLENNAGATLMHDRIQSYDGLYVTDGCSKATLDLARDSMLCMIEII NIQASLYNRISQYDSKKDSIDIIDNTKVVNIKHSDPNDPLSWPLVTLSNGEVYKTRLLVGADGFNSPTRRFSQ IPSRGWMYNAYGVVASMKLEYPPFKLRGWQRFLPTGPIAHLPMPENNATLVWSSSERLSRLLLSLPPESFTAL INAAFVLEDADMNYYYRTLEDGSMDTDKLIEDIKFRTEEIYATLKDESDIDEIYPPRVVSIIDKTRARFPLKL THADRYCTDRVALVGDAAHTTHPLAGQGLNMGQTDVHGLVYALEKAMERGLDIGSSLSLEPFWAERYPSNNVL LGMADKLFKLYHTNFPPVVALRTFGLNLTNKIGPVKNMIIDTLGGNEK

pETDuet-1-hAdR : Adrénodoxine réductase humaine

MGSSHHHHHHSQDPNSTQEKTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHPQAHVDIYEKQPVPFGLVRFGVAPDHPEVK NVINTFTQTAHSGRCAFWGNVEVGRDVTVPELREAYHAVVLSYGAEDHRALEIPGEELPGVCSARAFVGWYNG LPENQELEPDLSCDTAVILGQGNVALDVARILLTPPEHLERTDITKAALGVLRQSRVKTVWLVGRRGPLQVAF TIKELREMIQLPGARPILDPVDFLGLQDKIKEVPRPRKRLTELLLRTATEKPGPAEAARQASASRAWGLRFFR SPQQVLPSPDGRRAAGVRLAVTRLEGVDEATRAVPTGDMEDLPCGLVLSSIGYKSRPVDPSVPFDSKLGVIPN VEGRVMDVPGLYCSGWVKRGPTGVIATTMTDSFLTGQMLLQDLKAGLLPSGPRPGYAAIQALLSSRGVRPVSF SDWEKLDAEEVARGQGTGKPREKLVDPQEMLRLLGH

pET15b-ScAdx : Adrénodoxine de S. cerevisiæ

I.3) Milieu de culture

Le milieu LB (*Lysogeny Broth*) a été utilisé pour cultiver les souches bactériennes. Il est composé de 10 g de peptone (hydrolysat de matières protéiques), 5 g d'extrait de levure et de 5 g de NaCl pour 1 litre de milieu. Il est stérilisé pendant 20 min à 120°C. Pour les cultures sur boîtes de Pétri (milieu solide), 15 g d'agar par litre de milieu LB sont ajoutés.

Les antibiotiques nécessaires à la sélection des souches bactériennes sont ajoutés à raison de 100 mg par litre pour l'ampicilline, 34 mg par litre pour le chloramphénicol et de 12,5 mg par litre pour la tétracycline.

Pour la culture des protéines contenant un tag MBP, le milieu LB est supplémenté avec 0,2% de glucose (poids/volume), soit 2 g de glucose par litre de culture, afin de réprimer l'expression de l'amylase. En effet, cette enzyme peut altérer la fixation de la protéine taguée sur la colonne d'affinité permettant de la purifier.

Pour les cultures surexprimant les chaperonnes GroES et GroEL, l'induction se fait en supplémentant le milieu avec 0,2% de L-arabinose (poids/volume), soit 2 g de L-arabinose par litre de culture.

II) Biologie moléculaire

II.1) Préparation de bactéries compétentes

Classiquement, les bactéries sont rendues compétentes grâce à un traitement au chlorure de calcium qui va neutraliser les charges négatives de la membrane bactérienne et ainsi permettre au plasmide que l'on veut incorporer à la bactérie d'y adhérer.

Une pré-culture est réalisée sur la nuit à partir de la souche désirée en présence des antibiotiques nécessaires à la sélection des caractères voulus. Le lendemain, 100 mL de milieu de culture contenant les antibiotiques nécessaires sont ensemencés avec 2 mL de préculture et mis en culture à 37°C et à 200 rpm (rotations par minute). Lorsque la densité optique atteint 0,4 à 600 nm est atteinte, le milieu de culture est placé sur glace (4°C) pendant 15 min. A partir de cette étape, il est important que les cellules restent à une température inférieure à 4°C. Le milieu de culture est centrifugé pendant 10 min à 6000 rpm, 4°C. Les tubes de centrifugations sont placés dans de la glace, le surnageant est jeté et les cellules sont doucement resuspendues puis incubées pendant 30 min dans 25 mL d'une solution à 100 mM CaCl₂ en restant dans la glace. Après une deuxième étape de centrifugation de 10 min à 6000 rpm et 4°C, le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans 5 mL d'une solution à 100 mM CaCl₂ et 10% glycérol afin d'être aliquotées par 200 µL dans des tubes immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les stocks de cellules compétentes sont conservés à -80°C.

II.2) Transformation de bactéries par choc thermique

Classiquement, afin d'intégrer le plasmide désiré dans une souche bactérienne, une aliquote de 200µL de cellules compétentes de la souche désirée est placé dans la glace et mis à incuber pendant 30 min avec 1 µg de plasmide afin que l'ADN puisse se fixer sur les bactéries. Un choc thermique de 2 min à 42°C déstabilise la membrane bactérienne et facilite la pénétration du plasmide. Après 5 min à 4°C, 1 mL de milieu de culture sans antibiotique est ajouté aux cellules ainsi transformées qui sont mises en culture pendant 1 h à 37°C. Cette étape permet, pour les cellules ayant incorporé le plasmide, de démarrer la traduction du gène de résistance à l'antibiotique présent sur celui-ci. Ainsi, lorsqu'elles seront étalées sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique correspondant, elles pourront être sélectionnées. Classiquement, la boîte de Pétri est placée à l'étuve à 37°C sur la nuit et récupérée le lendemain matin, entourée de parafilm et placée au frigo, où elle peut être conservée pendant trois semaines.

II.3) Extraction et purification de plasmides

Une colonie de bactéries, classiquement des DH5α, sont transformées par le plasmide à amplifier est prélevée sur boîte de Pétri et mise en culture sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) dans 5 mL de milieu de culture contenant l'antibiotique approprié. Le lendemain, les bactéries sont collectées par centrifugation à 6800 *g* pendant 3 min à température ambiante/ L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique s'effectue grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). La méthode consiste en un traitement à la RNase suivi d'une lyse cellulaire basique qui dénature l'ADN chromosomique et les protéines. Le lysat est déposé sur une colonne de silice qui permet de retenir l'ADN plasmidique. Après deux lavages permettant d'enlever les impuretés, l'ADN plasmidique est élué avec de l'eau ou un tampon contenant une faible concentration en sel. La concentration en ADN plasmidique est déterminée en mesurant l'absorption à 260 nm de la solution sur un NanoDrop 2000 (ThermoScinetific).

III) Méthodes biochimiques

III.1) Analyse des protéines et électrophorèse

III.1.a) Dosage de protéines

Classiquement, le dosage de protéines est réalisé par la méthode de Bradford (Bradforf 1976). Le bleu de Coomassie présent dans la solution de dosage (Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5 X, Bio-Rad) va se fixer sur les résidus basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes de la protéine, absorbant alors à λ_{max} = 595 nm. La densité optique à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration en protéine. L'albumine de sérum bovin sert à la réalisation de la gamme étalon.

III.1.b) Electrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes

Cette technique analytique, appelée couramment SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est inspirée du protocole décrit par Laemmli. Elle permet de séparer les protéines d'un échantillon en fonction du poids moléculaire de leurs chaînes polypeptidiques, ainsi que d'estimer leur degré de pureté. Elle permet également d'analyser des cellules entières afin de contrôler le taux d'expression d'une protéine. Des marqueurs de poids moléculaires connus sont disponibles commercialement (Bio-Rad ou Fisher Scientific).

Les échantillons protéiques à analyser sont mélangés avec un tampon dénaturant concentré 4 fois (Tris-HCl pH 6,8 225 mM, SDS 8%, glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 3%, bleu de

bromophénol 0,02%). Le SDS (dodécylsulfate de sodium) est un détergent qui va dénaturer les protéines et les charger négativement. Le β -mercaptoéthanol permet de réduire les ponts disulfures éventuellement présents. Afin d'achever la dénaturation des protéines, les échantillons sont chauffés 6 min à 95°C puis centrifugés pendant 5 min à 15 000 rpm. Le gel de polyacrylamide utilisé pour la migration des échantillons protéiques comporte deux phases : une première partie avec peu d'acrylamide (4%) permettant de concentrer les échantillons en une fine bande protéique puis une deuxième partie permettant la séparation des protéines. Cette deuxième partie contient une plus grande proportion d'acrylamide, généralement entre 8 et 12% : ce pourcentage est ajusté afin de séparer au mieux les protéines autour de la zone d'intérêt. Lors de la préparation de gels d'acrylamide, on ajoute du glycérol dans la solution de séparation afin qu'elle soit plus dense et qu'on puisse couler directement la solution de concentration par-dessus, cf. Tableau 6 pour les compositions.

Solution mère		Séparation, 10%	Concentration, 4%
Tris-HCl 0,9 M (mL) <mark>pH 8,9</mark>	pH 6,8	4,44	0,84
Acrylamide/Bis (19:1) 40% (n	nL)	2,5	0,5
Eau ultrapure (mL)		1,91	3,56
Glycérol 50% (mL)		1	-
Persulfate d'ammonium (µL)		100	50
SDS 20% (µL)		50	50
TEMED (μL)		10	10

Tableau 6 : Exemple de composition d'un gel d'acrylamide 10% pour deux gels de 0,5 mm d'épaisseur.

La migration des échantillons protéiques est réalisée sous une différence de potentiel de 200 V pendant 40 à 50 min dans un tampon conducteur Tris-Glycine-SDS (Tris-HCl pH 8,3 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%), MOPS (MOPS 50 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, pH 7) ou MES (MES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0,1%, EDTA1 mM, pH 7,3) jusqu'à ce que le front de migration, visualisé grâce au bleu de bromophénol, atteigne le bas du gel. Les chaînes polypeptidiques, totalement dénaturées et chargées négativement de façon homogène, vont migrer à travers le gel grâce à la différence de potentiel et leur vitesse de migration ne dépendra que de leur poids moléculaire apparent, les plus petites migreront plus vite et les plus grosses plus lentement. Une fois la migration terminée, le gel est placé dans une solution de coloration (50% H₂O, 45% EtOH, 5% acide acétique et 150 mg de bleu de Coomassie pour un litre de solution). Au bout de 20 min, le gel est rincé une heure dans une solution de décoloration (70% H₂O, 20% EtOH, 10% acide acétique) : seules les protéines, qui ont une meilleure affinité pour le bleu de Coomassie que le gel d'acrylamide, restent colorées. Le gel est ensuite analysé à l'aide du Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

III.1.c) Western Blot

Dans les cas où la surexpression est faible, la protéine d'intérêt n'est pas visible sur gel et il s'avère nécessaire de réaliser un Western Blot avec un anticorps permettant de la visualiser.

Les tests de surexpression sont réalisés sur des cultures de 200 mL contenant les antibiotiques appropriés et induites avec 200 μ M d'IPTG. Au moment de l'induction et à la récolte des cellules, 1 mL de milieu de culture est récupéré et centrifugé. Le culot bactérien est resuspendu dans 50 μ L de bleu de charge et on dépose 4 μ L d'échantillon sur gel afin de pouvoir comparer les différentes cultures. Les cellules récupérées sont resuspendues dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5 à raison de 5 mL pour 1 g de cellules. On utilise comme inhibiteurs de protéases 100 μ L par gramme de cellules d'une solution d'un cachet de cOmplete EDTA free (Roche) pour 1 mL d'eau. Les cellules resuspendues sont ensuite cassées avec la microsonde du sonicateur à 25% de sa puissance maximale pendant 2,5 min en tout avec 5 s sonication 9 s de repos. On récupère 50 μ L de lysat qui est centrifugé à 10 000 *g* : le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 50 μ L de bleu de charge (dépôt de 4 μ L sur gel). Le reste du lysat est centrifugé 30 min à 15 000 *g* et le surnageant récupéré pour être déposé sur gel, 4 μ L.

On fait alors migrer le gel dans un tampon Tris-Glycine-SDS jusqu'à ce que le bleu de bromophénol permettant de visualiser le front de migration sorte du gel. Il n'est pas possible de colorer le gel au bleu de Coomassie mais on peut visualiser les protéines par fluorescence sous UV en faisant incuber le gel pendant 10 min dans 50 mL de tampon de migration contenant 10 µL de SYPRO Orange (Life Technologies).

Les protéines du gel sont alors transférées sur membrane de PVDF Immobilon-P (MerckMillipore) préalablement trempée dans du méthanol puis du tampon de migration. On utilise un système Transblot (Bio-Rad). L'électrotransfert se fait dans un tampon Tris-Glycine-Ethanol (Tris-HCl pH 8,3 25 mM, glycine 192 mM, 15% EtOH) pendant une heure à 100 V.

La membrane est alors récupérée et placée sur la nuit à 4°C dans une solution TBS-Tween (Tris-HCl pH 7,4 50mM, NaCl 150 mM, Tween 0,2%) contenant 5% de lait en poudre (Régilait). Les

sites non spécifiques (sans protéines) de la membrane vont alors être saturés grâce aux protéines du lait.

Le lendemain, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps primaire (ici, un anticorps de souris qui reconnaît les protéines avec un tag polyhistidine, Invitrogen) dilué au cinq centième dans du TBS-Tween-lait 5%. Elle est ensuite rincée pendant 3 x 10 min avec du TBS-Tween puis incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (ici, un anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase de raifort HRP, Amersham) dilué 2000 fois dans du TBS-Tween-lait 5%. Après une dernière série de trois lavages de 10 min au TBS-Tween, la membrane est séchée légèrement entre deux papiers Wattman.

La révélation des protéines reconnues par les deux anticorps se fait par la détection de l'activité de la peroxydase HRP. La membrane est incubée avec un mélange de luminol et d'eau oxygénée H₂O₂ (Amersham ECL start Western Blotting Detection Reagent, GE) : la peroxydase HRP va catalyser l'oxydation du luminol par l'eau oxygénée. Le produit de cette oxydation va évoluer spontanément vers un état stable en émettant de la lumière que l'on va pouvoir détecter avec une caméra CCD, on utilise un appareil Fujifilm LAS-4000.

III.2) Surexpression et purification des protéines

La culture des bactéries est réalisée dans des incubateurs Infors HT. L'ultracentrifugeuse est une Optima XPN-80 Ultra (Beckman Coulter). La sonication est réalisée avec une microsonde de 3 mm pour les volumes inférieurs à 5 mL et une sonde de 12,7 mm pour les autres sur un sonicateur Branson Digital Sonifier 450 (puissance maximale 400 W).

III.2.a) mBP-Coq6 de S. cerevisiæ, 96,5 kDa

i) Surexpression et récupération des extraits solubles

Des souches BL21 DE3 transformées par les plasmides pMALc2x-levCoq6 et pGro7 sont utilisées pour réaliser la surexpression. Une pré-culture est effectuée en milieu LB sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) en présence de 50 µg/mL d'ampicilline et 17 µg/mL de chloramphénicol. Le lendemain, le milieu de culture LB est inoculé avec 2,5% de la pré-culture en présence de 0,2% (poids/volume) de glucose, 0,2% (poids/volume) de L-arabinose (induction de la production de GroES et GroEL), 100 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol. La culture se fait à 37°C et sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre DO_{600 nm} = 0,6 : la culture est alors refroidie sous eau froide pendant 20 min et l'incubateur thermorégulé à 18°C. La surexpression de la protéine est alors induite avec 150 µM d'IPTG durant 26 h. Les cellules sont collectées par centrifugation à

5000 g pendant 10 min. Elles sont resuspendues à raison de 2 mL de tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 20 mM, 5% glycérol) par gramme de culot avec ajout d'un comprimé de cOmplete EDTA free (Roche) pour 3 L de culture. Toutes les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. La lyse des cellules se fait par sonication pendant 3 min avec des cycles de 10 s sonication / 30 s repos, la sonde étant réglée sur 40%. Après ultracentrifugation à 45 000 rpm avec un rotor Beckman 50.2Ti pendant 1h30, le surnageant, ou extraits cellulaires solubles, est récupéré puis filtré sur filtre de 0,22 μm : la partie trouble qui reste entre le surnageant et le culot n'est pas récupéré.

ii) Colonne d'affinité dextrine Sepharose

Le surnageant est purifié en plusieurs fois sur une colonne MBP-Trap HP (GE HealthCare) : la colonne contient une matrice Sepharose (**Se**paration-**Pha**rmacia-Aga**rose**) greffée avec des dextrines qui possèdent une bonne affinité pour la MBP. Cette étape se fait sur un système Akta Start doté d'une pompe péristaltique permettant de réaliser des gradients de tampon et d'un système de détection UV à 280 nm (maximum d'absorption des tryptophanes et tyrosines généralement présents dans les protéines).

La colonne est équilibrée avec le tampon A (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glycérol 5%) puis 15 mL de surnageant sont injectés, soit environ 400 mg de protéines. La colonne est alors lavée avec 7,5 volumes-colonnes de tampon A, puis un gradient en 4 volumes-colonnes (VC) de 0 à 40 % de Tampon A contenant 50 mM de maltose est effectué. La protéine est décrochée dès que le maltose en tout début de gradient : on observe un seul pic. Enfin la colonne est lavée avec 1 volume-colonne de tampon A avec 50 mM de maltose puis rééquilibrée pour l'injection suivante. Les fractions contenant la protéine sont sélectionnées par spectroscopie d'absorption UV-visible : les fractions possédant un rapport DO_{450 nm}/DO_{420 nm} supérieur à 1 sont rassemblées et concentrées à environ 10 mg/mL. Le signal à 450 nm est caractéristique du cofacteur flavinique contenu dans MBP-Coq6 alors que le signal à 420 nm vient d'un contaminant héminique.

iii) Colonne d'exclusion stérique Superdex S200

Une colonne d'exclusion stérique permet de séparer les protéines en fonction de leur volume hydrodynamique. Si on considère que les protéines et les complexes protéiques sont globulaires, ce volume est proportionnel à leur poids moléculaire et les espèces de plus haut poids moléculaires vont sortir en premier. Une calibration avec des protéines de poids moléculaires connus permet d'avoir une idée de la masse moléculaire associée à un volume de rétention donné.

Une colonne d'exclusion stérique Superdex S200 (GE Healthcare) séparant les protéines ayant un poids moléculaire situé entre 10 et 600 kDa est équilibrée avec le tampon B (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 5%) sur un système Akta Purifier. Les différentes formes oligomériques de MBP-Coq6 de *S. cerevisiæ*, qui absorbent à 450 nm, sont séparées de la MBP ainsi que de GroES, qui n'absorbent pas à 450 nm. On récupère alors deux fractions : une protéine oligomérique de poids moléculaire élevé (poids moléculaire supérieur à 600 kDa) et une protéine oligomérique correspondant au poids moléculaire d'un tétramère de MBP-Coq6 (poids moléculaire d'environ 400 kDa) qui sont concentrés à environ 10 mg/mL de protéine. On a un rendement d'environ 2 à 3 mg de protéine tétramérique par litre de culture.

III.2.b) Δ1-24Coq6 de Saccharoyces cerevisiæ, 51,5 kDa

Dans un premier temps, le protocole est le même que pour MBP-Coq6 de *S. cerevisiæ*. A l'issue de la Superdex 200, on récupère une forme oligomérique supplémentaire, correspondant à un monomère de MBP-Δ1-24Coq6 (poids moléculaire d'environ 100 kDa).

i) Clivage par le facteur Xa

On va réaliser le clivage du linker reliant la MBP à $\Delta 1-24$ Coq6 sur les monomères et tétramères de MBP- $\Delta 1-24$ Coq6. La protéine est diluée à 1 mg/mL dans un tampon Tris-HCl pH 8 20 mM, NaCl 150 mM, 2 mM CaCl2, glycérol 5% et le facteur Xa permettant le clivage (New England Biolabs) est ajouté avec un ratio de 1/50 en masse. La réaction est réalisée sur la nuit à 23°C et est arrêtée le lendemain matin avec 2 μ M de dansyl-glu-gly-arg-chlorométhylcétone. La protéine est alors concentrée puis diluée 10 fois avec le tampon C (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 20 mM, glycérol 5%).

ii) Colonne échangeuse d'anions Uno Q1

La colonne Uno Q1 (Bio-Rad) est une colonne échangeuse d'anions. A l'issue du clivage par le facteur Xa, le mélange protéique est chargé sur cette colonne préalablement équilibrée avec le tampon C sur l'Akta Purifier. La MBP ne s'accroche à la colonne et est éluée directement au cours du lavage de la colonne. Après un lavage de la colonne avec 5 volumes-colonnes de tampon C, un gradient de 0 à 45% en tampon D (Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 1 M, glycérol 5%) est réalisé en 15 volumes-colonnes. La protéine Δ 1-24Coq6 est éluée aux alentours de 200 mM de NaCl : on a un pic bien défini correspondant à une protéine monomérique, suivi d'un épaulement épaulement correspondant à un mélange de plusieurs formes oligomériques. Le pic et l'épaulement sont récupérés et concentrés séparément jusqu'à environ 5 mg/mL de protéine. On obtient environ 1 mg de protéine monomèrique par litre de culture.

III.2.c) Adrénodoxine réductase humaine (hAdR), 51.7 kDa

i) Surexpression et récupération des extraits solubles

Des souches BL21 DE3 transformées par les plasmides pETDuet-1-hAdR et pGro7 sont utilisées pour réaliser la surexpression. Une pré-culture est effectuée en milieu LB sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) en présence de 50 µg/mL d'ampicilline et 17 µg/mL de chloramphénicol. Le lendemain, le milieu de culture LB est inoculé avec 2% de la pré-culture en présence de 100 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol. La culture se fait à 37°C jusqu'à atteindre DO_{600 nm}=0,6 : à ce moment-là, 0,2% (poids/volume) de L-arabinose (induction de la production de GroES et GroEL) sont ajoutés. Lorsque DO_{600 nm}=1,5, l'incubateur est thermorégulé à 20°C. Une fois la température atteinte (DO_{600 nm}=1,7-1,8), on induit avec 200 µM d'IPTG durant 16 à 20 h. Les cellules sont collectées par centrifugation à 5000 g pendant 10 min. Elles sont resuspendues à raison de 3 mL de tampon E (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM) par gramme de culot avec ajout d'un comprimé de cOmplete EDTA free (Roche) pour 3 L de culture. La lyse des cellules se fait par sonication avec 3 cycles de 2 min de lyse (5 s sonication / 9 s repos) et 5 min d'attente entre chaque cycle, la sonde étant réglée sur 40%. Après ultracentrifugation à 45 000 rpm avec un rotor Beckman 45Ti pendant 1h30 à 4°C, le surnageant, correspondant aux extraits cellulaires solubles, est récupéré. Le tampon de lyse contient 20 mM d'imidazole et 500 mM de NaCl afin que, lors du passage du surnageant sur les billes chélatant du Ni²⁺, il y ait le minimum d'interactions non spécifiques entre les protéines et la résine.

ii) Colonne d'affinité Ni Sepharose

La protéine possédant un tag polyhistidine, elle possède une forte affinité pour le Ni²⁺: on va se servir de cette propriété pour la purifier.

Cette étape est réalisée à température ambiante à l'aide d'une colonne disposant d'un fritté. Des billes Ni-Sepharose (GE Healthcare), chargées avec des ions Ni²⁺, sont placées sur le fritté à raison de 1 mL de billes pour 15 mL de surnageant. Elles sont lavées avec 5 volumes-colonnes d'eau puis 10 volumes-colonnes de tampon E. Le surnageant est alors placé sur les billes et élué. Les billes sont lavées avec le tampon E jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéines éluées, ce qui est vérifié par Bradford. La protéine est ensuite éluée par paliers avec des volumes de tampon E contenant différentes concentrations d'imidazole : 31 mM imidazole (2 VC), 43 mM imidazole (2 VC), 54 mM imidazole (2 VC), 66 mM imidazole (8 VC), 89 mM imidazole (6 VC) et 135 mM imidazole (2 VC). Les fractions sont évaluées par spectrométrie d'absorption UV-visible : les fractions avec un rapport DO_{280 nm}/DO_{450 nm} inférieur à 16 sont rassemblées et concentrées.

iii) Colonne d'exclusion stérique Superdex S75

Une colonne d'exclusion stérique Superdex S75 (GE Healthcare) séparant les protéines ayant un poids moléculaire compris entre 3 et 70 kDa est équilibrée avec le tampon F (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 100 mM, glycérol 5%) sur Akta Purifier. Cette étape permet de séparer GroEL (n'absorbe pas à 450 nm, 60 kDa) de l'adrénodoxine réductase (absorbe à 450 nm, 51,7 kDa) : les fractions avec un rapport DO_{280 nm}/DO_{450 nm} inférieur à 8,5-9 sont rassemblées, concentrées et aliquotées. On obtient environ 2 mg de protéine par litre de culture.

III.2.d) ScAdx de *S. cerevisiæ*, 12,7kDa

i) Surexpression et récupération des extraits solubles

Des souches BL21 DE3 transformées par le plasmide pET15b-ScAdx sont utilisées pour réaliser la surexpression. Après une préculture sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) en présence de 100 µg/mL d'ampicilline, le milieu LB est inoculé à 2% par cette préculture en présence de 100 µg/mL d'ampicilline. La culture se fait à 37°C jusqu'à atteindre DO_{600 nm}=0,6 : à ce moment-là, on induit avec 750 µM d'IPTG et l'incubateur est thermorégulé à 25°C pendant 24 h. Les cellules sont collectées par centrifugation à 5000 g pendant 10 min. Elles sont resuspendues à raison de 5 mL de Tris-HCl pH 7,5 50 mM par gramme de culot avec ajout d'un comprimé de cOmplete EDTA free (Roche) pour 10 g de cellules. Toutes étapes suivantes sont réalisées à 4°C. La lyse des cellules se fait par sonication avec 6 cycles 30 s sonication / 30 s repos, la sonde étant réglée sur 40%. Après ultracentrifugation à 45 000 rpm avec un rotor Beckman 45Ti pendant 1h30, le surnageant, correspondant aux extraits cellulaires solubles, est récupéré.

ii) Colonne échangeuse d'anions Uno Q6

La protéine ne possédant pas de tag, le surnageant est dans un premier temps passé sur une Uno Q6 (Bio-Rad) avec des injections de 300 mg de protéine. Après un lavage de la colonne avec 5 volumes de Tris-HCl pH 7,5 50 mM, un gradient de 15 volumes-colonnes allant de 0 mM à 500 mM de NaCl est réalisé. Un gel permet de déterminer les fractions contenant ScAdx de *S. cerevisiæ* : la protéine est éluée aux alentours de 400 mM NaCl.

iii) Colonne de tamisage moléculaire Superdex S75

Une colonne d'exclusion stérique (Superdex S75, GE Healthcare) équilibrée avec un tampon G (Tris-HCl pH 7,5 25 mM, NaCl 50 mM) permet d'éliminer les contaminants restants. On obtient environ 25 mg de protéine par litre de culture.

III.3) Evaluation des cofacteurs

III.3.a) Dosage du fer

La quantité de fer est dosée par une méthode adaptée des travaux de Fish (Fish 1988). Pour établir la courbe d'étalonnage, une solution commerciale de Fe²⁺ (1005 µg/mL, Aldrich) diluée au $36^{\text{ème}}$ permet d'obtenir une solution de référence à 500 µM de Fe²⁺ et de réaliser des standards contenant respectivement 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 nmol de fer dans un volume final de 65 µL. De la même manière, différentes quantités de protéines, 0,5 ; 1 ; 2 et 4 nmol, sont mises en solution dans un volume final de 65 µL. L'ensemble des échantillons protéiques et des standards sont dénaturés par incubation avec 45 µL d'acide perchlorique 1 M pendant 15 min afin de récupérer le Fe²⁺ en solution. Après centrifugation pendant 5 min à 10 000 rpm, 90 µL de solution sont prélevés auxquels sont ajoutés 72 µL de batho-phénantroline disulfonate (1,7 mg/mL), 36 µL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 µL d'acétate d'ammonium (solution saturée diluée au 1/3) : on va pouvoir obtenir un complexe de fer II absorbant fortement dans le domaine visible. Après trente minutes d'incubation à température ambiante, la densité optique à 680 nm et à 535 nm sont mesurées et la valeur DO_{535 nm}-DO_{680 nm} permet de connaître la quantité de fer par monomère d'enzyme grâce à la courbe d'étalonnage.

III.3.b) Dosage du soufre

Le soufre est dosé par la méthode de Beinert (Beinert 1983). Un cristal translucide de sulfure de sodium (Na₂S,9H₂O, M = 240 g/mol) est pesé puis dissous à 20 mM dans de la soude 0,03 M. Une solution à 200 μ M dans de l'eau est obtenue à partir de cette solution mère. Des standards de 0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 nmol sont préparés dans un volume final de 100 μ L. De la même manière, différentes quantités de protéines, 3 et 4 nmol, sont mises en solution dans un volume final de 100 μ L. Le protocole consiste à dénaturer la protéine pendant trois heures par l'ajout simultané de 300 μ L d'acétate de zinc 1% et de 15 μ L de soude 3 M provoquant la précipitation immédiate d'hydroxyde de zinc. Après l'étape de dénaturation, les échantillons sont repris par l'ajout simultané de 75 μ L de DMPD (N,N-DiMéthyl-p-PhénylèneDiamine à 1 mg/mL dans HCl 5 M) et de 16 μ L de FeCl₃ (3,75 mg/mL dans HCl 1 M) conduisant à la formation lente de bleu de méthylène en quantité proportionnelle à la quantité de soufre initiale. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la densité optique à 670 nm et à 850 nm sont mesurées et la valeur DO_{670 nm}-DO_{850 nm} permet de connaître la quantité de soufre par monomère d'enzyme grâce à la courbe d'étalonnage.

III.3.c) Caractérisation des flavines

i) Détermination de la nature des flavines par HPLC

Afin de déterminer la nature la nature du cofacteur flavinique présent dans les flavoprotéines, une méthode par HPLC (High-performance liquid chromatography, chromatographie en phase liquide haute performante) en phase inverse a été adaptée de *Flavoprotein protocols* (Aliverti *et al.* 1999).

Une colonne analytique Hypersil GOLD[™] C18 2,1 x 50 mm (ThermoScientific) est utilisée sur une HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity. Le tampon A est composé de 5 mM d'acétate d'ammonium pH 6,5 et le tampon B est du méthanol. Le débit est fixé à 0,4 mL/min et la colonne est équilibrée avec 10% de tampon B. On suit la DO à 265 nm et 20 µL d'échantillon sont injectés. L'élution se fait en trois temps : 5 min à 10% de B, de 10 à 15% de B en 5 min et pour terminer 5 min à 15% de B. Des solutions étalons de 20 µM de FMN et de FAD sont injectées : le FMN est élué à 4,5 min et le FAD à 10,3 min.

Les échantillons à analyser, 100 μ L de protéine à environ 20 μ M de flavine, sont chauffés pendant 5 min à 95°C afin de dénaturer les protéines puis centrifugés pendant 10 min à 10 000 g : 20 μ L de surnageant, contenant le cofacteur, sont injectés.

ii) Détermination du taux de flavine

Afin de déterminer le taux de flavine par monomère de protéine, deux méthodes par spectrométrie UV-visible, adaptées *Flavoprotein protocols* (Aliverti *et al.* 1999), sont utilisées.

Dans un premier temps, le coefficient d'extinction molaire du FAD dans la protéine est déterminé. Un premier spectre d'absorption UV-visible d'une solution de protéine à environ 10 µM de FAD est réalisé et la DO à 450 nm notée. Ensuite, cette solution de protéine est dénaturée soit par ajout de 0,1% de SDS directement en solution (hAdR) soit par chauffage pendant 5 min à 95°C (MBP-Coq6). Dans le cas de la dénaturation thermique, l'échantillon est centrifugé pendant 15 min à 10 000g et le surnageant est récupéré. On réalise ensuite un spectre de l'échantillon avec 0,1% de SDS ou du surnageant : dans les deux cas, la protéine étant dénaturée, on retrouve le FAD libre en solution. Sachant que le coefficient d'extinction molaire du FAD libre à 450 nm est de 11,3 mM⁻¹ cm⁻¹, on peut déduire le coefficient d'extinction molaire du FAD dans la protéine ou FAD « stacké » par la relation :

$$\varepsilon_{450 nm} (FAD \ stack\acute{e}) = \frac{DO_{450 nm} (FAD \ stack\acute{e})}{DO_{450 nm} (FAD \ libre)} \times \varepsilon_{450 nm} (FAD \ libre)$$

Grâce à ce coefficient, on peut par la suite déterminer la concentration en FAD dans les différents échantillons de protéine. En déterminant par ailleurs la concentration en protéine de l'échantillon, on peut remonter au taux de flavine par protéine.

III.3.d) Titration des cofacteurs des enzymatiques

Les enzymes étudiées possèdent des cofacteurs actifs de façon oxydo-réductive et possédant des spectres d'absorption UV-visible caractéristiques sous forme oxydée ou réduite. Ils peuvent être réduits par un réducteur chimique et sont réoxydés par l'oxygène de l'air. Afin de connaître leur signature spectroscopique sous forme oxydée et réduite, une titration par ajout de petites portions d'un réducteur chimique en absence d'oxygène est réalisée en boîte à gants.

La boîte à gants utilisée est une LABstar sous flux d'azote (MBraun) et la titration des cofacteurs redox est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible grâce à un système de fibres optiques reliées à un spectromètre Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies). Tout échantillon ou consommable entrant dans la boîte à gants subi trois cycles vide/azote. Les tampons utilisés sont dégazés sous azote et rentrés dans la boîte à gants au moins un jour avant leur utilisation.

Si le réducteur utilisé est le NADPH, sa concentration est déterminée par sa densité optique, ou absorbance, à 340 nm avec comme coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{340 nm}$ (NADPH) = 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. S'il s'agit du dithionite de sodium (Na₂S₂O₄), sa concentration est déterminée grossièrement par son absorbance à 315 nm avec comme coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{315 nm}$ (dithionite) = 8 mM⁻¹cm⁻¹, puis plus finement par titration d'une solution de FAD libre de concentration connue avec comme coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{450 nm}$ (FAD libre) = 11,3 mM⁻¹cm⁻¹, avec des ajouts d'environ 0,1 éq par 0,1 éq.

Une fois la concentration en réducteur établie, la protéine contenant le cofacteur à titrer est diluée à environ 10μ M de cofacteur puis le réducteur ajouté 0,1 éq par 0,1 éq. Un spectre d'absorption UV-visible est réalisé après 5 min chaque ajout afin de s'assurer que la réduction est complète.

III.4) Tests d'activité de Coq6 de S. cerevisiæ

III.4.a) Conditions expérimentales

Les tests enzymatiques ont été réalisés sur trois formes protéiques de Coq6 de *S. cerevisiæ*: la forme oligomérique de MBP-Coq6, la forme tétamérique de MBP-Coq6 et la forme monomérique de Δ 1-24Coq6. Une concentration de 20 μ M de flavine « stackée » dans Coq6 est utilisée pour les tests. Les tests se font dans un volume de 100 μ L.

Les substrats testés sont les trois substrats synthétisés (FHB, FHQ et FPol, cf. partie IV ciaprès) dissous à 50 mM dans du DMSO. Leur concentration dans l'échantillon est de 500 µM.

Les tests ont été réalisés dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5 et 200 mM NaCl. Trois méthodes de réduction de la flavine de Coq6 en anaérobiose ont été utilisées :

- par 1 mM de NADPH via l'adrénodoxine réductase humaine(20 μM) et ScAdx de
 S. cerevisiæ (20 μM)
- par 2 mM de dithionite, un réducteur chimique
- par photochimie grâce à la déazaflavine, 2 μM final, en présence de 15 mM d'EDTA, un donneur d'électron sacrificiel. La cuvette, scellée par un septum, est irradiée 2 min sous lampe à Xénon à 280 W équipée d'un filtre passe-bande de 410 nm à 1200 nm (Asahi Spectra).

Après réduction, les échantillons sont ouverts à l'oxygène de l'air sans agitation pendant 15 min puis agités pendant 15 min à 300 rpm. Pour les échantillons contenant le NADPH, 500 μM de NADPH sont ajoutés et l'échantillon est à nouveau agité pendant 15 min. Après cela, 100 μL de solution « STOP » (EtOH/ACN 50:50) sont ajoutés afin d'arrêter la réaction et de faire précipiter les protéines. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10 000 g et les surnageants récupérés et placés au congélateur à -20°C en attendant d'être analysés. La stabilité de tous les produits a été au préalable testée dans ces conditions de stockage.

III.4.b) Analyse HPLC sur colonne C18

Les échantillons sont analysés par HPLC par injections de 20µL en utilisant les conditions décrites dans le Tableau 7.

	FHB	FHQ	FPol	
Colonne	Hypersil GOLD™ C18 2,1 x 50 mm			
Eluant A	H ₂ O 10	H ₂ O 10 mM acétate d'ammonium pH 4		
Eluant B	ACN/MeOH/H ₂ O, 70:20:10	ACN		
Conditions d'élution	60% B 20 min	45% B 25 min	55% B 25 min	
Temps d'élution du substrat	12,5 min	20 min	20 min	
Temps d'élution du	FHB-OH	_	FCat	
produit supposé	10,5 min		11 min	

Tableau 7 : Conditions d'analyse par HPLC des essais enzymatiques en fonction du substrat utilisé.

Des courbes étalons pour chaque substrat et produit ont été réalisés : la plus petite concentration détectable se situe à chaque fois entre 0,5 et 1 μ M.

IV) Analogues de substrats

Les solvants « secs » sont distillés sur CaH₂ la veille de leur utilisation puis stockés sous argon ou purifiés grâce à un purificateur de solvant MBraun MB SPS-800.

Les chromatographies éclairs (« flash chromatography ») sont réalisées sur un appareil RevelerisX2 (Grace). L'éluant s'écoule dans la colonne de silice sous pression d'air comprimé : c'est une méthode plus rapide et plus efficace que la purification sur colonne de silice « à la main ».

Les spectres RMN ¹H sont réalisés sur un appareil Bruker Avance III 300, qui résonne à 300,13 MHz, doté d'une sonde BBFO 5 mm avec un gradient z.

L'HPLC (High-performance liquid chromatography, chromatographie en phase liquide haute performance) est une 1260 Infinity (Agilent Technologies). La colonne préparative est une C-18 Atlantis Prep T3 10x250 mm (Waters). La colonne analytique est une C-18 Hypersil GOLD 2,1x50 mm (ThermoScientific).

Les spectres d'absorption UV-visible sont réalisés avec un spectromètre UV-Visible Cary 50 Scan (Agilent Technologies).

L'ensemble des synthèses est basé sur le travail de Lang et Steglish (2005). Le couplage avec le tertiobutyle de lithium est basé sur le travail de Bogenstätter et al (1999).
IV.1) Acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (FHB)

La voie de synthèse choisie pour le FHB (6) est la suivante :



Schéma 14 : Synthèse de l'acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (6). Après protection de la fonction hydroxyle du noyau aromatique, ce dernier est couplé à la chaîne farnésyle, suivent deux étapes de déprotection des fonctions carboxyle et hydroxyle.

3-iodo-4-(méthoxyméthoxy)benzoate de méthyle (2)

Sous argon, 2,252 g (8,1 mmol) de 4-hydroxy-3-iodobenzoate de méthyle **(1)** sont suspendus dans 15 mL de dichlorométhane sec. Puis 3,5 mL de di-isopropyl-éthylamine (DIEA, 20,25 mmol soit 2,5 éq) suivis de 1 mL de chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl, 13,2 mmol soit 1,6 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel qui devient limpide et est agité à température ambiante (TA) pendant 5 h. La réaction est suivie par CCM (chromatographie sur couche mince) avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (87,5:12,5).

Le milieu réactionnel est traité avec 30 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 40 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, on obtient 2,32 g de **(4)** sous forme de poudre jaune soit un rendement de 89%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 3,53 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,91 (s, 3 H, COOCH3), 5,23 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 7,10 (d, 1 H, ³J = 8,4 Hz, 5-H), 7,99 (dd, 1 H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,1Hz, 6-H), 8,48 (d, 1 H, ⁴J = 2,1 Hz, 2-H).

3-farnésyl-4-(méthoxyméthoxy)benzoate de méthyle (4)

La verrerie utilisée a été préalablement séchée à l'étuve sur la nuit et la réaction est réalisée sous argon avec du THF sec.

Chapitre II

387 mg (1,2 mmol) de **(2)** sont dissous dans 7 mL de THF sec dans un schlenk et refroidis à -20°C grâce à un mélange acétone/carboglace placé dans un Dewar. 480 µL (1,35 mmol) de bromure d'isopropylmagnésium (i-PrMgBr) à 2,9 mM dans du 2-méthyltétrahydrofurane (commercial) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue et le mélange est agité pendant 30 min à -20°C. On ajoute alors 400 µL (40 µmol) de Li₂CuCl₄ à 0,1M dans du THF (commercial) et on agite pendant 10 min. Une solution de 270 µL (1 mmol) de bromofarnésyle **(3)** dans 8 mL de THF sec est alors ajoutée goutte à goutte sur 20 min à l'aide d'une canule dans le milieu réactionnel. Lorsque l'addition est terminée, le mélange est agité pendant 1h30 à -20°C puis on le laisse revenir à température ambiante.

La réaction est traitée avec 15 mL d'une solution de NH₄Cl saturée. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 30 mL de NH₄OH 2 M puis 30 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du Na₂SO₄ et le solvant est évaporé, on obtient une huile jaune qui est purifiée sur colonne de silice avec 3% d'acétate d'éthyle dans du dichlorométhane. Au final, on obtient 110 mg d'une huile translucide, soit 27% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 1,60 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,69 (s, 3 H, 12'-H), 1,75 (s, 3 H, 13'-H), 1,97–2,13 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,38 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,50 (s, 3 H, OCH2OCH3), 3,89 (s, 3 H, COOCH3), 5,07–5,16 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,27 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,30–5,35 (m, 1 H, 2'-H), 7,08 (d, 1 H, ³J = 9 Hz, 5-H), 7,87 (m, 2 H, 2-H, 6-H).

Acide 3-farnésyl-4-(méthoxyméthoxy)benzoïque (5)

110 mg (275 µmol) de **(4)** sont dissous dans 1 mL d'eau et 3 mL de méthanol puis 13 mg (450 µmol, 2 éq) de LiOH sont ajoutés au milieu réactionnel qui est porté à 100°C pendant 3h30. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (87,5:12,5). Après retour à température ambiante, 20 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel ainsi que 2 mL de HCl 1 M. L'extraction se fait avec 3 x 30 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 2 x 20 mL d'eau puis 20 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du Na₂SO₄ et le solvant est évaporé, on obtient 90 mg d'une huile translucide qui est suffisamment pure (RMN) pour être engagée dans la réaction suivante (84% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,60 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,67 (s, 3 H, 12'-H), 1,73 (s, 3 H, 13'-H), 1,95–2,14 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,38 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,49 (s, 3 H, OCH2OCH3), 5,07–5,15 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,28 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,30–5,35 (m, 1 H, 2'-H), 7,11 (d, 1 H, ³J = 9,0 Hz, 5-H), 7,93–7,96 (m, 2 H, 2-H, 6-H).

Acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (6)

90 mg (230 µmol) de **(5)** sont dissous dans 2 mL d'isopropanol puis 43 mg (230 µmol, 1 éq) d'acide paratoluènesulfonique hydraté (APTS:H₂O) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est chauffé pendant 6 h à 60°C. La réaction est suivie par CCM avec un mélange dichlorométhane/méthanol (90:10). Lorsque la réaction est terminée, 25 mL d'eau sont mélangés au milieu réactionnel : le mélange réactionnel brut est extrait avec 3 x 15 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec de la saumure (NaCl 4 M), séchées avec Na₂SO₄ et évaporées. On obtient une huile jaune pâle qui est purifiée sur colonne de silice avec 1% de méthanol dans du dichlorométhane. On récupère 40 mg d'une huile translucide soit 51% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,59 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,66 (s, 3 H, 12'-H), 1,79 (s, 3 H, 13'-H), 1,90–2,12 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,41 (d, 2 H, ³JHH = 7,2 Hz, 1'-H), 5,06–5,09 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,31–5,35 (m, 1 H, 2'-H), 6,85 (d, 1 H, ³J = 9,0 Hz, 5-H), 7,87–7,91 (m, 2 H, 2-H, 6-H).

Afin de réaliser les tests enzymatiques avec un substrat le plus pur possible, le FHB (**6**) est purifié par HPLC sur colonne préparative (C18 Atlantis) équilibrée avec un mélange de 10% de A (H₂O avec 10 mM d'acétate d'ammonium à pH 4) et 90% de B (ACN/MeOH/H₂O, 70:20:10) et un débit de 2 mL/min. Un gradient de 90% à 100% de B en 20 min suivi de 5 min à 100% de B permet d'éluer le FHB à 21 min, aux alentours de 97% de B. Le profil d'élution est suivi à 250 nm. Un coefficient d'extinction molaire de 8,9 mM⁻¹.cm⁻¹ a été déterminé à λ_{max} = 250 nm, cf. Figure 12.



Figure 12 : Spectre d'absorption UV-visible du FHB (100 µM dans H₂O)

IV.2) Acide 3-farnésyl-4,5-dihydroxybenzoïque (FHB-OH)

La voie de synthèse choisie pour le FHB-OH (13) est la suivante :



Schéma 15 : Synthèse de l'acide 3-farnésyl-4,5-dihydroxybenzoïque (13). Afin d'atteindre le noyau aromatique désiré, la fonction méthoxy de l'iodovanilline (7) est transformée en fonction hydroxyle puis les deux hydroxyles sont protégés et la fonction aldéhyde oxydée en ester. Après couplage, les fonctions carboxyle et hydroxyles sont déprotégées.

3-iodo-4,5-dihydroxybenzaldéhyde (8)

La réaction est réalisée sous argon.

1,3 g (4,7 mmol) d'iodovanilline (7) sont dissous dans 10 mL de dichlorométhane sec et refroidi à 0°C à l'aide d'un bain eau/glace. 12,5 mL de BBr3 à 1 M dans le dichlorométhane (commercial) sont ajoutés puis le mélange est porté à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et 10 mL de méthanol froid sont ajoutés goutte à goutte. Ensuite, le mélange est porté à reflux pendant 30 min puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est resuspendu dans 30 mL d'eau et le mélange est extrait avec 3 x 40mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, on obtient 1,17 g d'un solide gris-vert, 89% de rendement, qui est directement engagé dans la réaction suivante.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 5,57 (s, 1 H, 4-OH), 5,91 (s, 1 H, 5-OH), 7,39 (d, 1 H, ⁴J = 1,7 Hz, 6-H), 7,76 (d, 1 H, ⁴J = 1,7 Hz, 2-H), 9,76 (s, 1 H, CHO).

3-iodo-4,5-bis(méthoxyméthoxy)benzaldéhyde (9)

Sous argon, 1,17 g (4,7 mmol) de **(8)** sont suspendus dans 15 mL de dichlorométhane sec. Puis 2,9 mL DIEA (16,8 mmol soit 3,5 éq) suivis de 1,14 mL de chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl, 14,1 mmol soit 3 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel qui devient limpide et est agité à température ambiante pendant 5 h.

Le milieu réactionnel est traité avec 30 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 40 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié sur colonne de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90:10). On obtient 1,27 g de poudre blanche soit 81% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 3,50 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,66 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 5,25 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 5,31 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 7,63 (d, 1 H, ⁴J = 1,8 Hz, 6-H), 7,95 (d, 1 H, ⁴J = 1,8 Hz, 2-H), 9,82 (s, 1 H, CHO).

3-iodo-4,5-bis(méthoxyméthoxy)benzoate de méthyle (10)

574 mg (1,63 mmol) de **(9)** sont dissous dans 20 mL de méthanol à 0°C auxquels sont ajoutés 244 mg de KOH (4,35 mmol, 2,7 éq) dissous dans 5,5 mL de méthanol puis rapidement 544 mg de diiode (2,14 mmol, 1,3 éq) dissous dans 5,5 mL de méthanol à 0°C. Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C puis traité avec 15 mL d'une solution de NH₄Cl saturée suivis de 5 mL de Na₂S₂O₃, le tout est extrait avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau puis de la saumure (NaCl 4 M) et enfin séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, on obtient **(10)** mélangé à des sels : le mélange est dissous dans de l'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Après évaporation, on obtient 476 mg d'une poudre blanche soit 77% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 3,50 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,66 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,89 (s, 3 H, COOCH3), 5,23 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 5,27 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 7,77 (d, 1 H, ⁴J = 1,8 Hz, 6-H), 8,15 (d, 1 H, ⁴J = 1,8 Hz, 2-H).

3-farnésyl-4,5-bis(méthoxyméthoxy)benzoate de méthyle (11)

La verrerie utilisée a été préalablement séchée à l'étuve sur la nuit et la réaction est réalisée sous argon avec du THF sec.

476 mg (1,25 mmol) de **(10)** sont dissous dans 8 mL de THF sec dans un schlenk et refroidis à -20°C grâce à un mélange acétone/carboglace placé dans un Dewar. 1400 μ L (3,75 mmol) de bromure d'isopropylmagnésium (i-PrMgBr) à 2,9 mM dans du 2-méthyltétrahydrofurane (commercial) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue et le mélange est agité pendant 30 min à -20°C. On ajoute alors 600 μ L (60 μ mol) de Li₂CuCl₄ à 0,1 M dans du THF (commercial) et on agite pendant 10 min. Une solution de 280 μ L (1,03 mmol) de bromofarnésyle **(3)** dans 8 mL de

THF sec est alors ajoutée goutte à goutte sur 20 min à l'aide d'une canule dans le milieu réactionnel. Lorsque l'addition est terminée, le mélange est agité pendant 1h30 à -20°C puis on le laisse revenir à température ambiante.

La réaction est traitée avec 15 mL d'une solution de NH₄Cl saturée. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 20mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 30 mL de NH₄OH 2 M puis 30 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du Na₂SO₄ et le solvant est évaporé. Le brut est purifié sur colonne de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95:5) : on obtient 80 mg d'une huile translucide (14% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,61 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,69 (s, 3 H, 12'-H), 1,74 (s, 3 H, 13'-H), 1,98–2,10 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,46 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,53 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,61 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,89 (s, 3 H, COOC*H3*), 5,10–5,14 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,20 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,25 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,30–5,35 (m, 1 H, 2'-H), 7,59 (d, 1 H, ⁴J = 2,1 Hz, 2-H), 7,66 (d, 1 H, ⁴J = 2,1 Hz, 6-H).

Acide 3-farnésyl-4,5-bis(méthoxyméthoxy)benzoïque (12)

80 mg (174 µmol) de **(11)** sont dissous dans 1 mL d'eau et 2 mL d'isopropanol puis 15 mg (357 µmol, 2 éq) de LiOH sont ajoutés au milieu réactionnel qui est porté à 100°C pendant 22 h. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (87,5:12,5). Après retour à température ambiante, 20 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel ainsi que 2 mL de HCl 1 M. L'extraction se fait avec 3 x 30mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 2 x 20 mL d'eau puis 20 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du Na₂SO₄ et le solvant est évaporé, on obtient 15 mg d'une huile translucide qui est suffisamment pure (RMN) pour être engagée dans la réaction suivante, 20% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,61 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,68 (s, 3 H, 12'-H), 1,75 (s, 3 H, 13'-H), 1,95–2,12 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,47 (d, 2 H, ³J = 6,9 Hz, 1'-H), 3,53 (s, 3 H, OCH2OCH3), 3,61 (s, 3 H, OCH2OCH3), 5,10–5,17 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,23 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,25 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,34–5,37 (m, 1 H, 2'-H), 7,66 (d, 1 H, ⁴J = 2,1 Hz, 2-H), 7,73 (d, 1 H, ⁴J = 2,1 Hz, 6-H).

Acide 3-farnésyl-4,5-dihydroxybenzoïque (13)

15 mg (34 µmol) de **(12)** sont dissous dans 3 mL d'isopropanol puis 16 mg (84 µmol, 2,5 éq) d'acide paratoluènesulfonique hydraté (APTS:H₂O) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est chauffé pendant 6 h à 60°C. La réaction est suivie par CCM avec un mélange dichlorométhane/méthanol (90:10). Lorsque la réaction est terminée, 25 mL d'eau sont mélangés

au milieu réactionnel : le brut est extrait avec 3 x 15 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec de la saumure (NaCl 4 M), séchées avec Na₂SO₄ et évaporées. On obtient une huile jaune pâle qui est purifiée sur colonne de silice avec 5% de méthanol dans du dichlorométhane. On récupère 3 mg d'une huile translucide, 25% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,62 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,69 (s, 3 H, 12'-H), 1,80 (s, 3 H, 13'-H), 2,01–2,14 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,43 (d, 2 H, ³J = 6,9 Hz, 1'-H), 5,07–5,12 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,34–5,37 (m, 1 H, 2'-H), 7,53 (s app, 2H, 2-H,6-H).

Le FHB-OH n'étant pas substrat potentiel et devant servir uniquement d'étalon, il n'est pas nécessaire de le purifier par HPLC. Un coefficient d'extinction molaire de 7,6 mM⁻¹.cm⁻¹ a été déterminé à λ_{max} = 255 nm et de 3,1 mM⁻¹.cm⁻¹ à λ_{max} = 290 nm, cf. Figure 13.



Figure 13 : spectre d'absorption UV-visible de FHB-OH (100 µM dans H₂O)

IV.3) Farnésylhydroquinone (FHQ)

La voie de synthèse choisie pour le FHQ (17) est la suivante :



Schéma 16 : synthèse du farnésylhydroquinone (17). Les fonctions hydroxyles sont protégées puis le noyau aromatique est couplé à la chaîne farnésyle et les fonctions hydroxyles déprotégées.

2-bromo-1,4-bis(méthoxyméthoxy)benzène (15).

Sous argon, 1 g (5,3 mmol) de bromohydroquinone **(14)** est dissous dans 10 mL de dichlorométhane sec. Puis 3,24 mL de di-isopropyl-éthylamine (DIEA, 18,6 mmol soit 3,5 éq) suivis de 1,2 mL de chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl, 15,9 mmol soit 3 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité à température ambiante sur la nuit. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (75:25).

Le milieu réactionnel est traité avec 30 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 40mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, le produit est purifié sur colonne de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95:5). On obtient 1,1 g d'une huile translucide, soit 75% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 3,48 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,53 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 5,11 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 5,18 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 6,95 (dd, 1 H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 3 Hz, 5-H), 7,08 (d, 1 H, ³J = 8,4 Hz, 6-H), 7,08 (d, 1 H, ⁴J = 3 Hz, 3-H).

2-farnésyl-1,4-bis(méthoxyméthoxy)benzène (16)

La verrerie utilisée a été préalablement séchée à l'étuve sur la nuit et la réaction est réalisée sous argon avec du THF sec.

Le bromofarnésyle **(3)**, orangé, a subi un lavage basique la veille ou le jour même de la réaction. 1 mL de **(3)** est dissous dans 30 mL de pentane et cette phase organique est lavée avec 3 x 20 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée avec du MgSO₄ sec préalablement placé à l'étuve puis évaporée. On obtient **(3)** sous forme d'une huile jaune pâle.

277 mg (1 mmol) de **(15)** sont dissous dans 5 mL de THF sec dans un schlenk et refroidis à -78°C grâce à un mélange acétone/carboglace placé dans un Dewar. 1,2 mL (2 mmol, 2 éq) d'une solution de tertiobutyl de lithium à 1,7 mM dans du pentane (commercial) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue et le mélange est agité pendant 30 min à -78°C. On ajoute alors 1 mL (100 µmol, 0,1 éq) de Li₂CuCl₄ à 0,1 M dans du THF (commercial) et on agite pendant 10 min : la solution est légèrement jaune. Une solution de 342 mg (1,2 mmol, 1,2 éq) de bromofarnésyle **(3)** dans 1 mL de THF sec est alors ajoutée à raison d'une goutte toutes les cinq secondes à l'aide d'une seringue. Une fois l'addition terminée, on obtient une suspension orangée qui est agitée pendant 3 h à -78°C puis on laisse revenir à température ambiante et la réaction se poursuit sur la nuit. Le lendemain, la solution est limpide et bleutée.

La réaction est traitée avec une solution de NH₄OH 2 M jusqu'à ce que la phase aqueuse passe du bleu à l'incolore. La phase aqueuse est alors extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 30 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du MgSO₄ et le solvant est évaporé, on obtient une huile jaune qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 4% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 45 mg (22% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,63 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,71 (s, 3 H, 12'-H), 1,74 (s, 3 H, 13'-H), 1,99–2,18 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,36 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,49 (s, 3 H, OCH2OCH3), 3,51 (s, 3 H, OCH2OCH3), 5,10–5,17 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,14 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,16 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,31–5,36 (m, 1 H, 2'-H), 6,83-6,88 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 7,01 (d, 1 H, ³J = 8,4 Hz, 6-H).

farnésylhydroquinone (17)

La manipulation se fait sous argon. 45 mg (113 μ mol) de **(16)** sont dissous dans 5 mL de méthanol puis 45 μ L (0,6 mmol, 5 éq) de chlorure d'acétyle (AcCl) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité sur la nuit à température ambiante. La réaction est suivie par CCM avec

un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (75:25). Le lendemain, 25 mL d'eau sont mélangés au milieu réactionnel : le mélange réactionnel brut est extrait avec 3 x 15mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec de la saumure (NaCl 4 M), séchées avec MgSO₄ et évaporées. On obtient une huile jaune pâle qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 8% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 16 mg (35% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,62 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,70 (s, 3 H, 12'-H), 1,78 (s, 3 H, 13'-H), 1,99–2,14 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,32 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 4,52 (s, 1 H, OH), 4,78 (s, 1 H, OH), 5,10–5,13 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,30–5,34 (m, 1 H, 2'-H), 6,58-6,63 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 7,00 (d, 1 H, ³J = 8,4 Hz, 6-H).

Afin de réaliser les tests enzymatiques avec un substrat le plus pur possible, le FHB est purifié par HPLC sur colonne préparative (C18 Atlantis) équilibrée avec un mélange de 30% de A (H₂O avec 0,1% TFA) et 70% de B (ACN) et un débit de 2 mL/min. Un gradient de 70% à 100% de B en 20 min permet d'éluer le FHQ **(17)** à 17 min, aux alentours de 85% de B. Le profil d'élution est suivi à 290 nm. Un coefficient d'extinction molaire de 3,9 mM⁻¹.cm⁻¹ a été déterminé à $\lambda_{max} = 292$ nm, cf. Figure 14.



Figure 14 : Spectre d'absorption UV-visible du FHQ (100 μM dans H₂O/EtOH/ACN 5:2,5:2,5)

IV.4) Farnésylphénol (FPol)

La voie de synthèse choisie pour le FPol (21) est la suivante :



Schéma 17 : synthèse du farnésylphénol (21). La fonction hydroxyle est protégée puis le noyau aromatique est couplé à la chaîne farnésyle et la fonction hydroxyle déprotégée.

1-bromo-2-(méthoxyméthoxy)benzène (19)

Sous argon, 1 mL (8,7 mmol) de 2-bromophénol **(18)** est dissous dans 15 mL de dichlorométhane sec. Puis 3,8 mL de di-isopropyl-éthylamine (DIEA, 21,8 mmol soit 2,5 éq) suivis de 1,3 mL de chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl, 17,4 mmol soit 2 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité à température ambiante sur la nuit. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (85:15).

Le milieu réactionnel est traité avec 30 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 40 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, le produit est purifié sur colonne de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95:5). On obtient 1,7 g d'une huile translucide soit 90% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 3,55 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 5,27 (s, 2 H, OC*H2*OCH3), 6,91 (m, 1 H, 5-H), 7,17 (m, 1 H, 3-H), 7,26 (m, 4-H), 7,57 (m, 1 H, 6-H).

1-farnésyl-2-(méthoxyméthoxy)benzène (20)

La verrerie utilisée a été préalablement séchée à l'étuve sur la nuit et la réaction est réalisée sous argon avec du THF sec.

Le bromofarnésyle **(3)**, orangé, a subi un lavage basique la veille ou le jour même de la réaction. 1 mL de **(3)** est dissous dans 30 mL de pentane et cette phase organique est lavée avec 3 x 20 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée avec du MgSO₄ sec préalablement placé à l'étuve puis évaporée. On obtient **(3)** sous forme d'une huile jaune pâle.

217 mg (1 mmol) de **(19)** sont dissous dans 5 mL de THF sec dans un schlenk et refroidis à -78°C grâce à un mélange acétone/carboglace placé dans un Dewar. 1,2 mL (2 mmol, 2 éq) d'une solution de tertiobutyle de lithium à 1,7 mM dans du pentane (commercial) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue et le mélange est agité pendant 30 min à -78°C. On ajoute alors 1 mL (100 µmol, 0,1 éq) de Li₂CuCl₄ à 0,1 M dans du THF (commercial) et on agite pendant 10 min : la solution est légèrement jaune. Une solution de 342 mg (1,2 mmol, 1,2 éq) de bromofarnésyle **(3)** dans 1 mL de THF sec est alors ajoutée à raison d'une goutte toutes les cinq secondes à l'aide d'une seringue. Une fois l'addition terminée, on obtient une suspension orangée qui est agitée pendant 3 h à -78°C puis on laisse revenir à température ambiante et la réaction se poursuit sur la nuit. Le lendemain, la solution est limpide et bleutée.

La réaction est traitée avec une solution de NH₄OH 2 M jusqu'à ce que la phase aqueuse passe du bleu à l'incolore. La phase aqueuse est alors extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 30 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du MgSO₄ et le solvant est évaporé, on obtient une huile jaune qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 2% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 100 mg (29% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 1,62 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,70 (s, 3 H, 12'-H), 1,74 (s, 3 H, 13'-H), 1,99–2,15 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,38 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,51 (s, 3 H, OCH2OCH3), 5,09–5,18 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,23 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,32–5,37 (m, 1 H, 2'-H), 6,95 (m, 1 H, 5-H), 7,05 (m, 1 H, 3-H), 7,14 (m, 1 H, 4-H), 7,30 (m, 1 H, 6-H).

2-farnésylphénol (21)

La manipulation est réalisée sous argon. 100 mg (292 µmol) de **(20)** sont dissous dans 5 mL de méthanol puis 45 µL (0,6 mmol, 2 éq) de chlorure d'acétyle (AcCl) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité sur la nuit à température ambiante. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (9:1). Le lendemain, 25 mL d'eau sont mélangés au milieu réactionnel : le brut est extrait avec 3 x 15 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec de la saumure (NaCl 4 M), séchées avec MgSO₄ et évaporées. On

obtient une huile jaune pâle qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 6% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 47 mg (52% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 1,63 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,71 (s, 3 H, 12'-H), 1,81 (s, 3 H, 13'-H), 2,01–2,17 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,40 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 5,10–5,16 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,15 (s, 2 H, OH), 5,34–5,39 (m, 1 H, 2'-H), 6,81-6,91 (m, 2 H, 3-H et 5-H), 7,12-7,17 (m, 2 H, 4-H et 6-H).

Afin de réaliser les tests enzymatiques avec un produit le plus pur possible, le FHB est purifié par HPLC sur colonne préparative avec un mélange de 20% de A (H₂O, 0,1% TFA/ACN 40:60) et 80% de B (H₂O, 0,1% TFA/ACN 90:10) et un débit de 2 mL/min. Le profil d'élution est suivi à 275 nm et le FPol sort à 25 min. Un coefficient d'extinction molaire de 1,9 mM⁻¹.cm⁻¹ a été déterminé à λ_{max} = 273 nm, cf. Figure 15.



Figure 15 : Spectre d'absorption UV-visible du FPol (100 μM dans H₂O/EtOH/ACN 5:2,5:2,5)

IV.5) Farnésylcatéchol (FCat)

La voie de synthèse choisie pour le FPol (25) est la suivante :



Schéma 18 : synthèse du farnésylcatéchol (25). Les fonctions hydroxyles sont protégées puis le noyau aromatique est couplé à la chaîne farnésyle et les fonctions hydroxyles déprotégées.

1-bromo-2,3-bis(méthoxyméthoxy)benzène (23)

Sous argon, 567 mg (3 mmol) de 2-bromobenzène-1,4-diol **(22)** sont dissous dans 10 mL de dichlorométhane sec. Puis 2,3 mL de di-isopropyl-éthylamine (DIEA, 13,5 mmol soit 4,5 éq) suivis de 900 µL de chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl, 12 mmol soit 4 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité à température ambiante sur la nuit. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (75:25).

Le milieu réactionnel est traité avec 30 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 40mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure (NaCl 4 M) puis séchées avec Na₂SO₄. Le solvant est évaporé, le produit est purifié sur colonne de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95:5). On obtient 730 mg d'une huile translucide, soit 88% de rendement.

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 3,52 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 3,69 (s, 3 H, OCH2OC*H3*), 5,21 (s, 4 H, OC*H2*OCH3), 6,94 (t, 1 H, ³J = 8,2 Hz, 5-H), 7,12 (dd, 1 H, ³J = 8,2 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 4-H), 7,23 (d, 1 H, ³J = 8,2 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 3-H).

1-farnésyl-2,3-bis(méthoxyméthoxy)benzène (24)

La verrerie utilisée a été préalablement séchée à l'étuve sur la nuit et la réaction est réalisée sous argon avec du THF sec.

Le bromofarnésyle **(3)**, orangé, a subi un lavage basique la veille ou le jour même de la réaction. 1 mL de **(3)** est dissous dans 30 mL de pentane et cette phase organique est lavée avec 3 x 20 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée avec du MgSO₄ sec préalablement placé à l'étuve puis évaporée. On obtient **(3)** sous forme d'une huile jaune pâle.

277 mg (1 mmol) de **(23)** sont dissous dans 5 mL de THF sec dans un schlenk et refroidis à -78°C grâce à un mélange acétone/carboglace placé dans un Dewar. 1,2 mL (2 mmol, 2 éq) d'une solution de tertiobutyl de lithium à 1,7 mM dans du pentane (commercial) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue et le mélange est agité pendant 30 min à -78°C. On ajoute alors 1 mL (100 µmol, 0,1 éq) de Li₂CuCl₄ à 0,1 M dans du THF (commercial) et on agite pendant 10 min : la solution est légèrement jaune. Une solution de 342 mg (1,2 mmol, 1,2 éq) de bromofarnésyle **(3)** dans 1 mL de THF sec est alors ajoutée à raison d'une goutte toutes les cinq secondes à l'aide d'une seringue. Une fois l'addition terminée, on a une suspension orangée qui est agitée pendant 3 h à -78°C puis on laisse revenir à température ambiante et la réaction se poursuit sur la nuit. Le lendemain, la solution est limpide et bleutée.

La réaction est traitée avec une solution de NH₄OH 2 M jusqu'à ce que la phase aqueuse passe du bleu à l'incolore. La phase aqueuse est alors extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 30 mL de saumure (NaCl 4 M). Elles sont séchées avec du MgSO₄ et le solvant est évaporé, on obtient une huile jaune qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 4% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 90 mg (22% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 1,62 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,73 (s, 3 H, 12'-H), 1,77 (s, 3 H, 13'-H), 1,99–2,15 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,46 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 3,52 (s, 3 H, OCH2OCH3), 3,63 (s, 3 H, OCH2OCH3), 5,09–5,17 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,14 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,21 (s, 2 H, OCH2OCH3), 5,32–5,37 (m, 1 H, 2'-H), 6,85-6,96 (m, 1 H, 4-H), 6,99-7,01 (m, 2 H, ³J = 8,4 Hz, 5-H, 6-H).

1-farnésyl-2,3-benzenediol ou farnésylcatéchol (25)

La manipulation est réalisée sous argon. 40 mg (100 µmol) de **(24)** sont dissous dans 3 mL d'isopropanol puis 48 mg (250 µmol, 2,5 éq) d'acide paratoluènesulfonique hydraté (APTS:H₂O) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est agité sur la nuit à température ambiante. La réaction est suivie par CCM avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (75:25). Le lendemain, 25 mL d'eau sont mélangés au milieu réactionnel : le brut est extrait avec 3 x 15mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec de la saumure (NaCl 4 M), séchées avec

MgSO₄ et évaporées. On obtient une huile jaune pâle qui est purifiée par chromatographie éclair : le produit d'intérêt est élué à 7% d'acétate d'éthyle dans du cyclohexane et on en récupère 25 mg (81% de rendement).

¹H NMR (300 MHz, CDCl3) : δ = 1,62 (s, 6 H, 14'-H, 15'-H), 1,70 (s, 3 H, 12'-H), 1,81 (s, 3 H, 13'-H), 2,00–2,18 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 3,40 (d, 2 H, ³J = 7,2 Hz, 1'-H), 5,09–5,13 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 5,32 (s, 1 H, OH), 5,32–5,38 (m, 1 H, 2'-H), 5,39 (s, 1 H, OH), 6,67-6,82 (m, 3 H, 4-H, 5-H, 6-H).

Le FCat n'étant pas substrat potentiel et devant servir uniquement d'étalon, il n'est pas nécessaire de le purifier par HPLC. Un coefficient d'extinction molaire de 2,1 mM⁻¹.cm⁻¹ a été déterminé à λ_{max} = 276 nm, cf. Figure 16.



Figure 16 : Spectre d'absorption UV-visible du FCat (100 μM dans H₂O/EtOH/ACN 5:2,5:2,5)

V) Méthodes biophysiques

V.1) Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les études en phase stationnaire des activités enzymatiques de l'adrénodoxine réductase humaine et ScAdx de *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisées sur un spectromètre UV-visible Jasco V-630. Les accepteurs d'électrons utilisés sont le ferricyanure (K₃[Fe(CN)₆], $\Delta \varepsilon_{420nm} = 1,02 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$), le DCPIP (Dichlorophénolindophénol, $\Delta \varepsilon_{520nm} = 6,8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) et le cytochrome c ($\Delta \varepsilon_{550nm} = 19,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Le ferricyanure est un accepteur d'électron ionique : $Fe(CN)_6^{3-} + e^- = Fe(CN)_6^{4-}$. La densité optique à 420 nm est due à l'espèce fer III et diminue donc quand celle-ci disparaît.

Le DCPIP est un accepteur d'électron chimique non chargé. La densité optique à 520 nm est due à l'espèce oxydante et diminue quand celle-ci disparaît :



Schéma 19 : demi-réaction rédox du DCPIP

Le cytochrome *c* est une protéine à hème intervenant dans la chaîne respiratoire. Ici, il s'agit du cytochrome *c* de cheval, purifié du cœur de cheval (Sigma Aldrich). La densité optique à 550 nm est due à l'espèce oxydante, qui est l'hème sous forme ferrique (Fe III), et diminue donc quand celle-ci disparaît pour être transformée en espèce réduite, l'hème sous forme ferreux (Fe II).

La densité optique à la longueur d'onde caractéristique de l'accepteur d'électron est suivie en fonction du temps. On considère qu'on se trouve dans les conditions de Michaelis-Menten quand moins de 10 % des substrats sont transformés en produits et la courbe obtenue est modélisée par une droite sur les 15 à 30 premières secondes. Le coefficient directeur de cette droite va permettre de calculer le nombre de moles de NADPH ou NADH consommées par nombre de moles de FAD contenu dans la protéine par seconde. En faisant varier la concentration en S (NADPH ou NADH), on va pouvoir tracer v = f([S]) et obtenir le K_M pour le NADPH ou le NADH et v_{max} en modélisant la courbe par :

$$v([S]) = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

V.2) Stopped flow en anaérobiose

V.2.a) Conditions expérimentales

Les expériences en *stopped flow* (flot arrêté) ont été réalisées sur un appareil Hi-Tech TGK Scientific SF-61 DX2 muni d'un bain circulant d'eau thermorégulé. Le substrat et l'enzyme sont dans deux seringues différentes. A chaque expérience, 50 µL de chacune des deux seringues sont mélangés extrêmement rapidement dans une chambre prévue à cet effet puis le flot est arrêté et on peut suivre la réaction soit à une longueur d'onde en spectroscopie d'absorption UV-visible soit sur une bande de longueur d'onde en spectroscopie de fluorescence. Le temps mort associé est inférieur à la milliseconde.

Les expériences réalisées sur la réaction de réduction du FAD de l'adrénodoxine réductase humaine par le NADPH ou le NADH, sont réalisées en anaérobie afin d'éviter la réoxydation lente

du FAD par l'oxygène de l'air. Pour cela, le stopped-flow est purgé de son oxygène pendant une nuit grâce à un mélange d'acide protocatéchique (PCA) à 200 μ M et de protocatéchuate dioxygénase (PCD) à 0,1 unité/mL (Patil et Ballou 2000). La protocatéchuate dioxygénase (de *Pseudomonas sp.* commerciale, Sigma Aldrich) est une enzyme qui catalyse la réaction de conversion de l'acide protocatéchique en acide β -carboxy-cis,cis-muconique grâce au dioxygène :



Schéma 20 : Action du PCD sur le PCA

Les seringues contenant les réactifs sont préparées avec le mélange PCA/PCD dans une boîte à gants LABstar sous flux d'azote (MBraun). Une fois prêtes, les seringues sont bouchées et entourées de parafilm puis sorties de la boîte à gants pour être utilisées le plus rapidement possible.

V.2.b) Modélisation de la réaction

On peut décrire les étapes élémentaires se déroulant par les équations ci-dessous :

FAD + NAD(P)H
$$\stackrel{k_1}{\iff}$$
 FAD : NAD(P)H $\stackrel{k_2}{\iff}$ FADH⁻ : NAD(P)⁺ $\stackrel{k_3}{\iff}$ FADH⁻ + NAD(P)⁺
 k_{-1} CT1, 530 nm CT2, 700 nm

Schéma 21 : Réduction de la flavine de l'adrénodoxine réductase par le NADH ou le NADPH

On a d'abord formation du complexe de transfert de charge 1 (CT1) également appelé complexe de Michaelis-Menten: il s'agit d'un équilibre où le FAD contenu dans l'adrénodoxine réductase lie le NADPH ou le NADH avec une affinité plus ou moins grande. On définit la constante d'équilibre thermodynamique de dissociation du CT1 avec $K_d = k_{-1}/k_1$. Par la suite, il y a transfert d'hydrure du NADPH ou du NADH au FAD de l'adrénodoxine réductase et formation du complexe de charge 2 (CT2). On considère que la réaction retour est négligeable et que la dissociation du CT2 est très rapide.

Pour suivre ces différentes étapes, on va se placer à 450 nm, 530 nm et 700 nm. Le CT1 absorbe à 530 nm et le CT2 à 700 nm. Les traces sont modélisées grâce au logiciel KaleidaGraph. Quand la vitesse de formation du CT1 est rapide, on observe une seule phase que l'on peut modélisée par une exponentielle :

$$DO(t) = Ce^{-k_{obs}t} + DO_{\infty}$$

Quand la vitesse de formation du CT1 est suffisamment lente, on va pourvoir observer deux phases : une croissance du signal suivi de son extinction. On modélise alors la trace obtenue à 530 nm par une somme de deux exponentielles :

$$DO(t) = \frac{k_{obs1}}{k_{obs2} - k_{obs1}} \left(C_1 e^{-k_{obs1}t} + C_2 e^{-k_{obs2}t} \right) + DO_{\infty}$$

En faisant varier la concentration initiale en NADPH ou NADH, S, on peut récupérer différentes traces et modéliser k_{obs} en fonction de $[S]_0$ afin de déterminer les différentes constantes de réaction. En théorie, Penatti *et al.* 2008, on va avoir :

-
$$k_{obs1}([S]) = k_1[S] + C \text{ pour } k_{obs1}$$

 $k_{obs}([S]) = \frac{k_2[S]}{K_d + [S]} \text{ pour } k_{obs} \text{ et } k_{obs2}$

V.3) Spectroscopie de fluorescence

V.3.a) Origine de la fluorescence

D'après l'approximation de Born-Oppenheimer, l'énergie totale d'une molécule peut s'écrire comme la somme de ses énergies électronique, vibrationnelle et rotationnelle. Cette énergie totale est discrète. Les niveaux d'énergie électronique sont liés aux orbitales moléculaires dans lesquelles peuvent se trouver les électrons de la molécule. Les niveaux d'énergie vibrationnelle sont liés à la vibration des atomes les uns par rapport aux autres, les liaisons n'étant pas rigides, les différences d'énergies entre les états vibrationnels sont beaucoup plus petites que celles entre les états énergétiques. Les niveaux d'énergie rotationnelle sont attribués à la rotation de la molécule libre selon des axes privilégiés, elle peut être négligée dans les liquides et les solides.

Les phénomènes d'absorption et d'émission de photons résultent des transitions entre ces différents niveaux d'énergie. L'absorption d'un photon va porter la molécule d'un état fondamental à un état excité. Cet état excité n'est pas stable et va évoluer vers un état métastable correspondant à l'état excité singulet de plus basse énergie par des processus non radiatifs. Depuis cet état métastable, le retour se fait vers différents états vibrationnels de l'état fondamentale : on a alors le phénomène de fluorescence avec émission de photons. L'intensité de la fluorescence suit une loi exponentielle et la durée de vie de l'état excité, τ , est définie comme l'inverse de la vitesse de désexcitation.

Pour acquérir un spectre d'émission de fluorescence, l'échantillon est excité à une longueur d'onde donnée est on enregistre l'intensité du rayonnement de fluorescence émis dans la fenêtre de longueur d'onde voulue. Pour réaliser un spectre d'excitation, on fait varier la longueur d'onde d'excitation en enregistre et on mesure l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde d'émission fixée.

La fluorescence est mesurée à 90° du faisceau incident afin que celui-ci ne perturbe pas le signal.

V.3.b) Inhibition de la fluorescense

L'inhibition de fluorescence ou « quenching » apparaît quand des molécules interagissent avec la molécule siège de la fluorescence : on a alors une diminution du signal de fluorescence. Il existe deux sortes de « quenching » : l'un est dit statique et l'autre dynamique.

Le phénomène de « quenching » statique se manifeste lorsque le fluorophore, F, interagit à l'état fondamental avec une autre molécule, Q : le complexe formé FQ n'est pas fluorescent. Si on considère que la fluorescence s'éteint complétement quand le complexe se forme et que l'intensité observée est uniquement due au fluorophore libre, on peut alors écrire :

$$\frac{I_0}{I} = \frac{[F_0]}{[F]} = \frac{[F] + [FQ]}{[F]} = 1 + \frac{[Q]}{K_D} \text{ avec } QF + Q \rightleftharpoons FQ, \quad K_D = \frac{[F][Q]}{[FQ]}$$

En traçant I_0/I en fonction de [Q], on obtient une droite et on peut déterminer une constante de dissociation du complexe.

Le phénomène de « quenching » dynamique se manifeste lorsque le fluorophore à l'état excité, F*, va rencontrer une autre molécule : la collision va faire retourner F à son état fondamental sans qu'il puisse émettre de photons. On peut alors déduire une constante de « quenching » k_q en traçant I_0/I en fonction de [Q] grâce à la loi de Stern-Volmer :

 $\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau[Q]$ avec τ la durée de vie de l'état excité et $k_q \tau = K_{SV}$, la constante de Stern-Volmer

Il peut s'avérer qu'il y ait un mélange de « quenching » statique et dynamique. Dans ce cas, la relation de linéarité entre I_0/I et [Q] n'est plus valable. On peut alors considérer, Valeur 2001, que le « quenching » dynamique s'applique à la fraction de molécules fluorescentes (et donc non complexée). On a alors :

$$\frac{I}{I_0} = \left[\frac{I}{I_0}\right]_{dyn} \times \frac{[F]}{[F_0]}$$

En utilisant les deux équations précédentes on a donc :

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q]) = 1 + (K_{SV} + K_S)[Q] + K_{SV}K_S[Q]^2 , K_S = 1/K_D$$

En traçant I₀/I en fonction de [Q], on doit donc obtenir une parabole dont la modélisation permettra de déduire K_{SV} et K_s ($K_s = 1/K_D$).

RESULTATS

CHAPITRE III : Purification, caractérisation biochimique et étude structurale préliminaire de Coq6 de *S. cerevisiæ*

I) Introduction

La voie de biosynthèse de l'ubiquinone est essentielle chez les eucaryotes : chez l'homme, des maladies génétiques lourdes associées à une espérance de vie courte sont liées à des mutations sur les gènes codant pour les enzymes entrant directement en jeu dans cette biosynthèse (Laredj *et al.* 2014). Parmi les mutations génétiques répertoriées, celles affectant Coq6 sont associées à un syndrome néphrotique cortico-résistant et une surdité neurosensorielle (Heeringa *et al.* 2011). La caractérisation biochimique et structurale de l'homologue de cette enzyme chez *S. cerevisiæ* (33% d'identité de séquence) peut donc s'avérer intéressante pour comprendre le lien entre mutation et impact sur la biosynthèse de l'ubiquinone.

Par homologie de séquence, Coq6 de S. cerevisiæ peut être classée parmi les monooxygénases à flavine de classe A, cf. Figure 17 page suivante. En effet, elle possède les motifs de liaison au FAD caractéristiques des monooxygénases de classe A (GxGxxG, DG, GD, Van Berkel et al. 2006) ainsi qu'une séquence représentative des monooxygénases à flavine de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone présente chez Ubil, UbiH et UbiF (monooxygénases des bactéries). Ubil est l'homologue bactérien de Coq6. Parmi les protéines présentées dans l'alignement de séquences, SalH et pHBH sont des protéines représentatives de la classe A des monooxygénases à flavine. La salicylate hydroxylase, SalH, a été la première protéine de cette classe à être purifiée et caractérisée, son activité dépend du NADH (White-Stevens et Kamin 1972, White-Stevens et al. 1972). La para-hydroxybenzoate hydroxylase, pHBH, est considérée comme la protéine canonique de cette classe et a été caractérisée d'un point de vue enzymatique ainsi que structurellement avec son cofacteur FAD et son substrat (Schreudeur et al. 1989, Entsch et Van Berkel 1995). PqsL, la quinolone oxydase, intervient dans la biosynthèse de la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, une molécule impliquée dans la détection du quorum (Diggle et al. 2006) et relativement similaire à l'ubiquinone avec un noyau aromatique et une chaîne hydrophobe, cf. Schéma 22. Ubil de E. Coli et E. carotovora ainsi que PQSL et pHBH ont été cristallisées et possèdent des structures tridimensionnelles similaires. PQSL et pHBH, contrairement à Ubil, ont été cristallisées avec leur cofacteur FAD.



Schéma 22 : Modifications réalisées par SalH, pHBH, PqsL, UbiF, UbiH, Ubil et Coq6.

Cog 6_S_cerecisiae Ubi/_E_Coli UbiF_E_Coli UbiH_E_Coli PQSL_P2_aeruginou SaIH_P2_putida pHBH_P2_fluorescer	1 MFFSKVMLTRRILVRØL/ 1 	A TAKSSA PKL TOVLIVOGOPAOLTILAASTKNSPOLKO MOSVOVA VOGOMVOLAVACOLO XOSPOVIAGOGMVOLAVACOLO MTNOPTEIAIVOGOMVOLAVACOLO MTNOPTEIAIVOGOMVOLALACOLO MSVIIVOGOMAGATLALAISKL MTDNHIDVLINGCOIGOANLANLLO MMTNAKFALRVAIVOGOISGLALALSSC MKTLKTOVAIIGAOPSOLLLOCLH	LKT UVDMVDLKDKLSDFNNSPPD OSGLRVAVLEORVOEPLAANAPPOL GSGLRVAVLEORVOEPLAANAPPOL OHGFSVTVIENAEPAFVADSOPDV SHOALPVHLIEATAPESHAHPOFDG ROGRVVVVEQARRERAING. KHSKLNVUEPAAAPGEVQQQ.	FINRIVSVTRRSIH RVSAINAASECLLR RISAISAASVSLLK RAIAAASVSLLK RAIAAASVSLLK ADLLKPAGIRVVE - VSFOPNAVRAIV - AGVLEOOMVDLLR	FLEN - NAGATL 103 RLG VWQ DI 70 HIG VWQ NL 70 GLG VWQ AV 72 RIG VWQ SL 69 AAG LLAEV 60 GLGLG GAYFQV 75 EAG VSRR 67							
Coq6_S_cerecislae Ubif_E_Coli Ubif_E_Coli Ubif_E_Coli Ubif_E_Coli PQSL_Ps_aeruginos Salf_Ps_buida oHBH_Ps_fluorecer	104 MHD RIO Y DOLYVITOG C 71 LSRASCYHOMEWOKD 71 VAQRVSPYNDXOVWOKD 73 QAMR QHPYNDXOVWOKD 73 QAMR QHPYRLETWEWE 76 ADC - ATAITTVHVSDRÖ 67 TROG RVRHELEVY-HD 76 ADRTPOPWEDIWFEWR 78 88 MDAEOLVHDÖFELALNÖ	SKATLDLAR - DEMLOMIE IN IGASLYNRIEGYDSKH SFOHISFDDOSMG YSHLGHIVENSVIHYALWWKAHO SFOKISFSGEFOFSHLGHIIEN PVIOQUWORASOL 7. HVMFDAAELKIPLLGMWVHIVLOOALWOALEA HAGFVTLAAEDYOLAALGOVVELNVGORLFALERA SELRYENYSSVDARSYFILMCSSLRRIVEKIDE 3DASYLGATIAGVGQSSVHRADFLDALVKH ELTHIDLKALTGQSSWIYG - OTEVTRDLMAAREAA	D SID I I D N T K V V N K H S D P N D P L SW SDI T L L A P A E L Q Q A W Q E N E SDI T L L S P T S L K Q A W Q E N E P K V T L N V Q S L I A L H R D N D L P Q V L H C P O P V A N A R T Q	PLVTLSNGEVVKTR TFLTLKDGSMLTAR AFITLODDSXLTAR QELELKGGEVIRAR VEVTLESGETLTGF DQVRLNDGRVLRPR LQVLFRDGTEKRCD TFFHGGEAFRLECD	L V G ADG F N SP 208 L V I G ADG A N SW 169 L V G ADG A H SW 169 L V G ADG A H SW 169 L V G ADG A H SO 170 V V A ADG T H SA 167 V V G ADG I A SY 166 L I G R DG I K SA 189 Y I AGC DG F H GV 167							
Coq6_S_cerecisiae Ubil_E_Coli Ubil_Er_carotovora UbiF_E_Coli UbiH_E_Coli PQSL_Ps_aeruginos SalH_Ps_putida pHBH_Ps_fluorecer	207 I.P. R.F. I.P.S.R. 170 L.R. N.K.AOIPLT. 171 V.P. O.M.AOIPLT. 180 L.A. T.A.OV. 170 L.P. V.V. 171 V.P. V.V. 172 L.P. V.V. 174 L.P. V.V. 175 L.P. V.V. 176 L.P. V.V. 177 L.P. V.V. 178	WMY NAYO VVASMKLEY PP. FKLROWORF FWDYG HALVANIT RTEP. HDAVAROFF FWDYG HALVANIT RTEP. HOXXAROFF AWOYAQS CMLIS VQCEND PQDSTWOFF FRPYPEPMUVGFALAPC VAENNEN FSGTCAYROMVDELQLREAYRING IDEHLVDVPOMYL VHOENN VFERVYPFGWLGVLADTPP VHOENN	LPTOPIANLPMPE - NNATLVWS S HGEGILAFLPLSOPHLCSIVWSLSP HGEGILAFLPLSOPHLCSIVWSLSP TPDOPRAFLPLFD - NWASLVWYDSP TRHOPLAMLPMSD - GRCSLVWCHPL DSGOGLAFY PIGFDRARLVWSFPR GLYGHILTFPVRKORIVNVVAFTSD KHAROFALCSMRSPTRSRWYLGVP	RLSRLLLSLPPESF EEAQRMQQASEDEF EQALVXQSLPVEEF VRIRQLQNMNMAQL ERREEVLSWSDEKF EEARELMADTRQES RSQPEPTWPADAPW • VEEALDEWSDQRF	TAL INAAFVLE 293 NBALNIAFDNR 256 NBQVAXAFDXR 256 QAEIAKHFPSR 256 CBELQSAFGWR 253 LRRRLQRFVGD 254 VREASQREMLD 273 WDELKTRLPSA 253							
Cogé, S_cereciaise 294 DADMNYYYRTLEDÖSMDTDKLIEDIKFRTEEIYATLKDESDIDEIYPRYVSIIDKTRAFPLKLT-HADRYGTDRVALVÖDAAHTTHPLAOGCHMGOTDVHG 996 (bil.E_Coil) 257 Lo LOKVESAROVPLTGR-WARDFASHRLALVÖDAAHTTHPLAOGCVHLGFMDAAE 311 (bil.E_carotovira) 257 Lo LOELESERGTPLXGR-WARSFASHRLALVÖDAAHTTHPLAOGCVHLGFMDAAE 311 (bil.E_carotovira) 257 Lo LOELESERGTPLXGR-WARSFASHRLALVÖDAAHTTHPLAOGCVHLGFXDVAE 311 (bil.E_coil) 257 LO VYTPLAAG, AFPLTRR-HALOYVÖDAAHTTHPLAOGCVHLGFXDVAE 311 (bil.E_coil) 254 LO YTPLAAG, AFPLTRR-HALOYVÖDAAHTTHPLAOGCVHLGFXDVAE 310 (bil.E_coil) 254 LO YTPLAAG, AFPLTRR-HALOYVÖDAAAHTTHPLAOGCVHLGFXDVAE 310 (bil.E_coil) 254 LO YTPLAAG, AFPLTRR-HALOYVÖDAAADTLHPLAOGCVHLGFXDVAE 308 PQSL_Ps_aeruginooz 255 ES AEAIAVTGTSFKÖLPIÖVL NUDAAADTLHPLAOGCMULAIE DAS 314 SAH/Ps_putda 274 AFAG WÖDARALECIPATHTUNALHDERLEPOVUHAAADTLAHE LAAF 314 314 SAH/Ps_putda 274 AFAG WÖDARALECIPATHTUNALHDERLEPOVUHAAASLALAAAADAHLAIE DAS A314 216 AAANTHUS 204 274 AFAG 274 AFAG 274 AFAG 274 AFAG 274 AFAG 274												
Coq0_S_cempciale 307 LYALEKAMERG LDIGS LS LEPFWAERYPSNNVLLGMADKLEKLYHTNFPPVV AL TFGLNLTNKIGPVKMILIDTLGGNEK 479 Lbil_E_Coli 312 LIAELKRLHRG KDIGOVIYLRYERSKKASAALMLAGMOOFRDLFSOTNPAKK LLDIGLKLADTLPOVKPOLIRGAMGLNDLPEWLR 400 Lbil_E_coli 312 LIAELKRLHRG KDIGOVIYLRYERSKKASAALMLAGMOOFRDLFSOTNPAKK LLDIGLKLADTLPOVKPOLIRGAMGLNDLPEWLR 400 Lbil_E_coli 312 LIAELKRLGTOG KDIGOVLYRYERSKKASAALMLAGMOOFRDLFSOTNPAKK LLDIGUKLADTLPOVKPOLIRGAMGLNDLPEWLR 400 Lbil_E_coli 312 LIAELKRLGTOG KDIGOVLYRYERSKKASAALMLAGMOOFRDLFSOTNPAKK LLDIGUKLADKLFOIKETLVROASGLHDLPEWLR 400 Lbil_E_coli 301 LIAELKRLGTOG KDIGOVLYRYERSKKASAGERELFDEONPAKK LLDIGUKLADKLFOIKETLVROASGLHDLPEWLR 400 Lbil_E_Coli 300 LAGTUSACK KINDPL FUNCKASKASKASKASKASKASKASKASKASKASKASKASKASK												
	-											
Motifs de liaison au FAD typiques des monooxygénases à flavine de classe A												
	INIOTITS	de haison au FAD typiques des monooxyg	enases a flavine de classe A									
	Motifs Motif	commun des monooxygénases à flavine de	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ub	oiF, UbiH)								
	Motif Inserti	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ut	oiF, UbiH)								
	Motifs Motifs Inserti Séque	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ut ie de Coq6	biF, UbiH)								
Protéine	Organisme d'origine	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ubil ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6	ығ, UbiH) Code PDB	Présence de FAD							
Protéine Ubil	Organisme d'origine Escherichia coli	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ubil ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28%	Code PDB	Présence de FAD non							
Protéine Ubil Ubil	Organisme d'origine Escherichia coli Erwinia carotovora	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Uk ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28% 28%	Code PDB 4K22 4N9X	Présence de FAD non non							
Protéine Ubil Ubil UbiH	Organisme d'origine Escherichia coli Erwinia carotovora Escherichia coli	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Uk ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28% 28% 28%	Code PDB 4K22 4N9X	Présence de FAD non non							
Protéine Ubil Ubil UbiH UbiF	Corganisme d'origine Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 ince supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ut ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28% 28% 28% 27% 24%	Code PDB 4K22 4N9X - -	Présence de FAD non -							
Protéine Ubil Ubil UbiH UbiF PQSL	Corganisme d'origine Corganisme d'origine Escherichia coli Erwinia carotovora Escherichia coli Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ut ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28% 28% 28% 28% 24% 24%	ы, Uын) Соde PDB 4К22 4N9X - - - 2X3N	Présence de FAD non non - - oui							
Protéine Ubil Ubil UbiH UbiF PQSL pHBH	Motifs Motifs Motif Inserti Séquer Organisme d'origine Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens	commun des monooxygénases à flavine de on caractéristique de Coq6 nce supposée d'adressage à la mitochondr Fonction monooxygénase de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone probable monooxygénase à flavine para-hydroxybenzoate hydroxylase	enases a flavine de classe A e l'ubiquinone (Coq6, Ubil, Ut ie de Coq6 Pourcentage d'identité de séquence avec Coq6 28% 28% 28% 27% 24% 20% 15%	ы, Uын) Соde PDB 4К22 4N9X - - 2X3N 1PBE	Présence de FAD non non - - oui oui							

Figure 17 : Alignement des séquences peptidiques de Coq6, Ubil, UbiF, UbiH, SALH et pHBH à l'aide du logiciel ClustalW.

On constate également la présence à l'extrémité N-terminale d'une courte séquence peptidique de 24 acides aminés uniquement présente chez Coq6 de *S. cerevisiæ*, seule protéine d'origine eucaryote dans l'alignement présenté Figure 17 : il s'agit probablement de la séquence d'adressage à la mitochondrie de Coq6 qui est également présente chez d'autres Coq6 eucaryotes

comme le rat, le bœuf, l'homme, la poule, le crapaud ou *C. elegans*, cf. Figure 18. Cette séquence est composée essentiellement de résidus cationiques et de résidus hydrophobes et possède une longueur variable : de 14 acides chez *C. elegans* à 52 chez la poule (se reporter à la page 94 pour plus de précisions sur la séquence d'adressage à la mitochondrie).

Enfin, on constate la présence d'une séquence appelée « insertion caractéristique de Coq6 » absente chez Ubil mais présente chez les Coq6 eucaryotes et particulièrement longue chez *S. cerevisiæ* : 50 acides aminés chez *S. cerevisiæ* contre 34 à 36 chez les autres Coq6 présentées, cf. Figure 18. Cette séquence possède de nombreux acides aminés polaires et chargés : il est possible qu'elle soit essentielle à l'intégration de Coq6 au sein du complexe protéique de biosynthèse de l'ubiquinone par des interactions ioniques.



Figure 18 : Alignement des séquences peptidiques de Coq6 de rat, bœuf, homme, poule, crapaud, C. elegans et S. cerevisiæ à l'aide du logiciel ClustalW. K155, G248 et A361 de Coq6 de S. cerevisiæ
 correspondent respectivement aux mutations R162X, G255R et A353D chez l'homme (Heeringa et al. 2011); D201 à D208H (Zhang et al. 2014) et F420 à Y412C (Doimo et al. 2014).

Des études in vivo tendent à prouver que Coq6 de S. cerevisiæ réalise l'hydroxylation en C-5

lors de la biosynthèse de l'ubiquinone (Ozeir et al. 2011). Cependant, l'intermédiaire accumulé lors

de leurs expériences, l'hexaprénylhydroquinone, diffère du substrat proposé historiquement pour Coq6, l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque, cf. partie III.I.b du chapitre I page 33 pour plus de détails. L'identité chimique du substrat de Coq6 reste donc hypothètique.

Une étude réalisée au laboratoire sur Ubil de *E. coli*, homologue fonctionnel de Coq6, a permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de l'enzyme tronquée de ses 45 derniers acides aminés. Ubil ne contient pas de cofacteur flavinique et n'a pu être étudiée d'un point de vue enzymatique mais son repliement général est proche de celui de la pHBH, cf. Figure 19 (Hajj Chehade *et al.* 2013).



Figure 19 : Superposition des structures de Ubil tronquée (en bleu, résolue à 2 Å, code PDB 4K22) et de pHBH (en jaune avec son cofacteur FAD en mauve, résolue à 1,9 Å, code PDB 1PBE). L'écart en moyenne quadratique entre les deux structures est de 3 Å.

Il s'avère donc que, jusqu'à présent, aucune monooxygénase à flavine de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez les bactéries ou la levure (UbiF, UbiH, UbiI et Coq6) n'a été étudiée enzymatiquement *in vitro*.

Par ailleurs, des études *in vivo* chez la levure ont montré que, de façon inhabituelle pour une monooxygénase flavine de classe A, Coq6 nécessite la présence de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine pour être fonctionnelle. En effet, la majorité des monooxygénases de classe A reçoit les électrons nécessaires à la réduction de leur cofacteur directement du NADPH ou du NADH et n'ont généralement pas besoin d'une chaîne de transfert d'électrons plus complexe.

II) Purification de la protéine de fusion MBP-Coq6 de S. cerevisiæ

Nos collaborateurs du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux à Grenoble ont obtenu des résultats préliminaires concernant la purification de Coq6 de *S. cerevisiæ in vitro* (M. Ozeir). Le choix du système d'expression s'est porté sur *E. coli* dans le but d'obtenir une protéine soluble en quantité suffisante pour réaliser les tests envisagés, y compris les études structurales.

Coq6 étant une protéine de levure, la séquence du gène codant avait été alors optimisée afin de pouvoir la surexprimer dans *E. coli*. Il s'est avéré que la surexpression hétérologue de Coq6 de *S. cerevisiæ* chez la bactérie menait à la formation d'agrégats de protéines non solubles appelés corps d'inclusion : il n'était donc pas possible de récupérer la protéine dans la fraction soluble lors de la lyse des cellules.

Nos collaborateurs ont donc choisi de produire une protéine de fusion avec la maltose binding protein (MBP) à l'extrémité N-terminale : MBP-Coq6 (plasmide pMALc2x-levCoq6, réalisé par N. Labessan). En effet, la MBP est fréquemment utilisée comme tag de solubilisation (Kapust *et* Waugh, 1999). Elle permet d'augmenter la solubilité de la protéine et de diminuer sa propension à former des corps d'inclusion lors de la surexpression. Ici, un linker peptidique de 26 acides aminés clivable par le facteur Xa a également été intégré entre la MBP et Coq6. Ce linker, une fois coupé, devrait permettre d'obtenir uniquement Coq6 sans son tag MBP si elle est soluble. On pourra alors s'affranchir de la partie MBP susceptible de perturber l'activité de la protéine d'intérêt.

Dans les conditions expérimentales utilisées par nos collaborateurs, MBP-Coq6 ne contenait pas de cofacteur flavinique. Au laboratoire, nous avons donc essayé d'améliorer la teneur en cofacteur flavinique de MBP-Coq6.

II.1) Surexpression et colonne d'affinité dextrine Sépharose

Dans un premier temps, la culture bactérienne s'est faite avec des souches BL21 (DE3) transformées par le plasmide pMALc2x-levCoq6. L'ajout de 400 μ M d'IPTG à DO_{600 nm} = 0,4 a permis d'induire l'expression de la protéine et la culture a été réalisée sur la nuit à 15°C chez *E. coli*. La surexpression de protéines à basse température est connue pour limiter la formation de corps d'inclusion (Schein 1989). En effet, les interactions hydrophobes à l'origine des réactions d'agrégation sont diminuées (Kiefhaber *et al.* 1991) et l'activité des protéases est moindre : cellesci, en digérant les protéines surexprimées par *E. coli*, donnent naissance à des formes peptidiques qui vont favoriser les corps d'inclusion (Chesshyre et Hipkiss 1989). De plus, les températures basses ralentissant la croissance bactérienne, la surexpression de la protéine d'intérêt est

Coq6

également plus lente, ce qui favorise le bon repliement des chaînes polypeptidiques et l'incorporation des cofacteurs.

A l'issue de la culture, les bactéries sont lysées : on constate qu'une grande partie de Coq6-MBP est dans le culot, cf. Figure 20A. Les extraits totaux solubles sont purifiés sur colonne d'affinité dextrine Sepharose ou MBP-trap (principe expliqué dans la partie III.2.a.i du chapitre II page 51) et on récupère MBP-Coq6 (96 kDa) qui est relativement pure. Une bande correspondant au poids moléculaire de la MBP (42,5 kDa) est présente sur la colonne du gel correspondant à la fraction protéique en sortie de MBP-trap : il est possible qu'au cours de la surexpression de la MBP-Coq6 des protéases endogènes à *E. coli* aient clivé le linker reliant la MBP à Coq6.

On constate tout d'abord que la protéine est jaune, signe qu'elle contient sans doute de la flavine. La réalisation d'un spectre d'absorption UV-visible le confirme et révèle une signature spectroscopique typique d'un cofacteur flavinique avec les deux bandes caractéristiques à 370 nm et 450 nm, cf. Figure 20B. Cependant, on observe une bande d'absorption vers 420 nm. Ce signal peut correspondre à la bande de Soret de protéines héminiques contaminantes. Sachant que le coefficient d'extinction molaire des protéines héminiques est environ dix fois plus élevé que celui des flavoprotéines, il est normal de ne pas observer de bande clairement définie représentant ce contaminant sur le gel mais de constater sa présence en spectroscopie d'absorption UV-visible.

La nature du cofacteur flavinique a été déterminée par la méthode décrite dans la partie III.3.c.i du chapitre II page 56 : il s'agit de FAD. L'utilisation de la méthode décrite dans la partie III.3.C.ii du même chapitre page 56 permet d'estimer qu'il y a environ 0,2 molécule de FAD par monomère de protéine.



Figure 20 : MBP-Coq6 sans chaperonnes après MBP-trap. A. Gel d'électrophorèse Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MOPS. t_{ind}, cellules au temps d'induction, t_{ent}, cellules entières. **B. Spectres** d'absorption UV-visible de la protéine après la MBP-trap et du FAD libre.

Nous sommes donc bien en présence d'une flavoprotéine avec un cofacteur FAD, ce qui renforce l'hypothèse de Coq6 comme monooxygénase à flavine de classe A.

II.2) Comportement oligomérique de MBP-Coq6

Afin de déterminer sous quelle(s) forme(s) oligomérique(s) MBP-Coq6 existe, une colonne d'exclusion stérique analytique Superdex (S200 10/300) est réalisée avec la protéine purifiée à l'issue de la MBP-trap, cf. Figure 21A. On suit le profil d'élution à 280 nm et à 450 nm, longueur d'onde d'absorption du FAD. D'après les volumes d'élution, on constate la présence de trois états oligomériques absorbant tous les trois à 450 nm : environ 50% d'oligomère(s) de grande taille (>700 kDa), 35% de tétramère (env. 350 kDa) et 10% de monomère (env. 100 kDa). Enfin, la MBP est éluée à un volume correspondant à une taille d'environ 40 kDa, cf. Figure 21B.



Figure 21 : Etats oligomériques de MBP-Coq6 sans chaperonnes. Tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 150 mM NaCl. A. Profil d'élution de MBP-Coq6 sur Superdex 200 10/300. B. Courbe de calibration de la Superdex 200 10/300. Ve volume d'élution de la protéine d'intérêt, Vt volume total de la colonne, Vo volume mort de la colonne.

Des spectres d'absorption UV-visible de MBP-Coq6 dans ces trois états oligomériques sont réalisés, cf. Figure 22A. Le contaminant héminique se trouve essentiellement dans la fraction « oligomérique ». Le tétramère et le monomère, quant à eux, possèdent un spectre de flavine clairement reconnaissable : une bande vers 370 nm correspondant à la transition électronique $S_0 \rightarrow S_2$ et une autre vers 450 nm avec deux épaulements vers 420 nm et à 470 nm correspondant à la transition électronique $S_0 \rightarrow S_2$ et une autre vers 450 nm avec deux épaulements vers 420 nm et à 470 nm correspondant à la transition électronique $S_0 \rightarrow S_1$. Ces deux épaulements du massif à 450 nm ne sont pas présents sur un spectre d'absorption UV-visible de flavine libre : leur présence indique que la flavine est bien liée dans la protéine et qu'elle possède un environnement hydrophobe peu accessible au solvant (Massey *et* Ganther 1965).

Afin d'étudier l'équilibre entre les différentes formes oligomériques de Coq6-MBP, les fractions correspondant au(x) oligomère(s), au tétramère et au monomère sont séparées,

concentrées et réinjectées sur la colonne. Chaque forme oligomérique de Coq6-MBP est éluée au volume d'élution initialement observé, ce qui signifie que les formes tétramérique et monomérique sont stables et que la transition entre les formes monomérique, tétramérique et oligomérique est irréversible, cf Figure 22B.



Figure 22 : Etude des états oligomériques de MBP-Coq6 sans chaperonnes. Tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 150 mM NaCl. A. Spectres d'absorption UV-visibles des différentes formes de MBP-Coq6. B. Réinjections des différentes formes sur Superdex 200 10/300, comparaison avec le chromatogramme de départ à 280 nm.

Lors des purifications ultérieures, une Superdex 200 préparative a été réalisée à la suite de la colonne MBP-trap. On obtient alors environ 200 µg de forme tétramérique par litre de culture avec environ 0,25 FAD par monomère de protéine. Ce rendement est faible car une grande proportion de la protéine est sous forme de gros oligomères. De plus, une grande partie de la protéine surexprimée se trouve dans les corps d'inclusion.

Afin d'obtenir une proportion plus grande de MBP-Coq6 dans la fraction soluble et d'augmenter la teneur en FAD de la protéine, nous avons utilisé des chaperonnes lors de la surexpression de MBP-Coq6, comme décrit dans la partie III.2.A du chapitre II page 50. Les chaperonnes protègent et aident au repliement des protéines produites, empêchant ainsi que des interactions hydrophobes entre protéines mal repliées mènent à la formation de corps d'inclusion (de Marco *et al.* 2007).

Dans notre cas, nous obtenons effectivement une proportion de MBP-Coq6 dans le surnageant plus importante qu'en l'absence de chaperonnes, ce qui nous conduit à purifier 2 à 3 mg de tétramère par litre de culture, un rendement 10 à 15 fois supérieur à celui obtenu précédemment. Un autre effet bénéfique de l'utilisation de ces chaperonnes lors de la surexpression est l'augmentation du taux de flavine par monomère de protéine qui est 0,8 pour la



Tableau 8 : Comparaison des formes protéiques de MBP-Coq6 purifiées en fonction de la présence des chaperonnes GroES et GroEL. 1. Quantité de protéine purifiée après la colonne MBP-trap pour un litre de culture. 2. Quantité de protéine purifiée selon les différentes formes oligomériques pour un litre de culture, estimation de la quantité de FAD par monomère de protéine. 3. Spectres d'absorption UV-visible des différentes formes oligomériques purifiées présentés de sorte que la densité optique à 280 nm soit d'environ 1.

II.3) Tentative de clivage du lien entre la MBP et Coq6 par le facteur Xa

Un essai de clivage du linker présent entre la MBP et Coq6 a été réalisé afin de récupérer Coq6 seule, cf. partie III.2.b.i du chapitre II page 52. Le clivage s'est fait dans un premier temps avec la protéine en sortie de MBP-trap en présence de 20% de glycérol car sa présence peut permettre de stabiliser et d'améliorer la solubilisation de protéines ayant tendance à s'agréger. Une fois le clivage réalisé, la protéine est concentrée jusqu'à 8 mg/mL et un précipité apparaît dans le tampon. L'échantillon est donc centrifugé et on dépose sur gel le surnageant et le culot, cf. Figure 23. La bande protéique correspondant à MBP-Coq6 est présente essentiellement dans le culot : elle n'a donc pas été entièrement coupée et a en partie précipité, peut-être à cause de la présence des gros oligomères. Dans le surnageant, on a principalement de la MBP (bande entre 30 et 50 kDa). Dans le culot, on peut deviner une bande aux environs de 50 kDa qui pourrait être Coq6. Cette bande n'est pas du tout présente dans le surnageant, il semble donc que Coq6 seule ne soit pas soluble.



Figure 23 : Tentative de clivage de MBP-Coq6. Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MOPS, t_f : temps final à l'issue du clivage.

De la même façon, les essais menés sur la forme tétramérique de MBP-Coq6 n'ont pas permis d'obtenir Coq6 sous forme soluble.

III) Purification de Δ1-24Coq6 de S. cerevisiæ

En analysant la séquence de la protéine surexprimée à l'aide du logiciel Mitoprot, on constate que Coq6 possède à l'extrémité N-terminale une séquence très probable d'adressage à la mitochondrie de 24 d'acides aminés, cf. Figure 17 et Figure 18 pages 86 et 87. L'algorithme de calcul utilisé permet de prédire l'existence de telles séquences (Claros *et* Vincent 1996) grâce à leur composition en acides aminés.

En effet, chez les organismes eucaryotes, les protéines mitochondriales situées dans la matrice sont produites par des ribosomes libres et possèdent généralement une séquence formant une hélice alpha amphipathique formée de résidus cationiques (arginine, lysine) d'un côté et de résidus hydrophobes de l'autre et exempte de résidus anioniques (aspartate, glutamate). Cette hélice, longue d'environ 20 à 50 résidus, possède une forte affinité pour les phospholipides de la membrane mitochondriale et va permettre à la protéine de se lier et de s'intégrer à la mitochondrie. Par la suite, cette séquence d'adressage est clivée de la pré-protéine : on obtient alors la protéine mature, cf. Figure 24 (Chacinska *et al.* 2002, Wiedemann *et al.* 2002).



Figure 24 : Import dans la mitochondrie des pré-protéines possédant une séquence d'adressage N-terminale à la mitochondrie. (a) La séquence d'adressage forme une hélice amphipathique avec des résidus chargés positivement d'un côté (en vert) et un segment hydrophobe de l'autre (en rouge). La séquence d'adressage est d'abord reconnue par les récepteurs Tom20 et Tom22 à la membrane externe (OM). Après son passage par le pore d'import général (GIP), la séquence d'adressage peut interagir avec les sites de reconnaissance de l'espace intermembranaire de Tom22 et TIM23 (en bleu). (b) La séquence d'adressage est transloquée à travers le canal de TIM23 grâce à la force électrophorétique du potentiel membranaire. (c) La pré-protéine se lie au moteur d'import fonctionnant grâce à l'ATP et composé de la chaperonne mitochondriale mtHsp70 associée à la membrane interne grâce à Tim44 et liant la co-chaperonne Mge1. La force générée par le moteur mtHsp70 déplie la pré-protéine et conduit à sa translocation dans la matrice. (d) La peptidase de maturation mitochondriale (MPP) lie la pré-séquence qui est dans une conformation étirée et la clive : la protéine mature est alors obtenue et présente dans la matrice mitochondriale.

Par ailleurs, des études ont montré que la forme entière de Coq6 de *S. cerevisiæ* pouvait être importée dans la mitochondrie puis clivée de sa séquence d'adressage à la mitochondrie (Gin *et al.* 2003). Des expériences de traduction *in vitro* de Coq6 en présence de méthionine marquée au soufre ³⁵S ont ainsi montré que le produit obtenu n'était pas homogène : deux bandes protéiques sont présentes sur gel, la première correspondant à la protéine entière, cf. Figure 25.

	1	2	3
Mitochondries	-	+	+
Protéinase K	-	-	+
м —	-	11	-

Figure 25 : Import mitochondrial *in vitro* de Coq6. 1. Protéine marquée issue de la traduction *in vitro*.
2. Protéine marquée issue de la traduction *in vitro* incubée avec des mitochondries isolées de souche sauvage de levure. 3. Comme 2. mais avec un traitement à la protéinase K post import. Echantillons chauffés avec le tampon de dépôt sur gel 5 min à 100°C avant analyse sur gel d'acrylamide 12% et autoradiographie. E : forme entière de Coq6 M : forme mature de Coq6.
Quand la protéine marquée est incubée en présence de mitochondries isolées de levure, on observe l'apparition d'une troisième bande juste en-dessous de celle correspondant à la protéine entière : il s'agit de la protéine mature privée de sa séquence d'adressage à la mitochondrie et intégrée à celle-ci. Une expérience supplémentaire lors de laquelle les mitochondries sont traitées par la protéinase K une fois la protéine importée, montre que seule la protéine mature (protégée à l'intérieur de la mitochondrie) est présente sur gel une fois l'échantillon traité. La différence de poids moléculaire entre les deux formes, entière et mature, est d'environ 3 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire des 24 premiers acides aminés de la séquence de Coq6 (2,7 kDa).

On peut alors supposer que cette séquence d'adressage à la mitochondrie, absente dans la protéine mature et active mais présente dans MBP-Coq6 probablement sous forme d'une hélice amphipatique, a une influence sur le repliement de la protéine d'où la tendance à l'agrégation de celle-ci lors de sa surexpression. Une construction permettant la surexpression de la protéine sans cette séquence mais toujours avec le tag MBP, appelée MBP-Δ1-24Coq6, a donc été réalisée au laboratoire (M. Smadja).

III.1) Surexpression et purification de MBP-Δ1-24Coq6

Les conditions de cultures et de purifications de MBP-Δ1-24Coq6 sont les mêmes que celles de MBP-Coq6 jusqu'à la colonne d'exclusion stérique, cf. partie III.2.a du chapitre II page 50. La proportion de protéine dans le surnageant est plus importante que dans le culot, cf. Figure 26A, ce qui signifie que la présence de la séquence d'adressage à la mitochondrie perturbait bien la solubilité de la protéine. Par ailleurs, si on compare les profils de chromatographie d'exclusion stérique (Superdex 200), cf. Figure 26B, on constate des différences assez importantes au niveau des états oligomériques entre MBP-Coq6 et MBP-Δ1-24Coq6. En effet, pour MBP-Δ1-24Coq6, on constate l'apparition d'une forme hexamérique, une proportion de forme tétramérique renforcée et une forme monomérique bien plus importante comparé à MBP-Coq6. La séquence N-terminale, supprimée de MBP-Δ1-24Coq6, renforçait donc bien la tendance de MBP-Coq6 à la formation d'oligomères de haut poids moléculaire.



Figure 26 : Purification de MBP-Δ1-24Coq6. A. Gel d'électrophorèse de surexpression et de lyse. Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MOPS. t_{ind}, cellules au temps d'induction, t_{ent}, cellules entières.
B. Comparaison des profils d'élution à 280 nm et 450 nm sur Superdex 200 26/60 de MBP-Coq6 et MBP-Δ1-24Coq6. Tampon Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 5%.

Au final, on obtient trois fois plus de protéine avec la construction MBP-Δ1-24Coq6 (5,8 mg/L de culture pour les monomère et tétramère) qu'avec la construction MBP-Coq6 (2 mg/L de culture pour les monomère et tétramère). Le contenu en cofacteur flavinique, quant à lui, est similaire pour les deux constructions : il est évalué pour les formes de MBP-Δ1-24Coq6 à 0,2 FAD par monomère de protéine pour la forme oligomérique, 0,4 pour la forme hexamérique et 0,85 pour les formes tétramérique et monomérique, cf. Tableau 9.

Protéine	post- MBP ¹	Formes purifiées ²		Gel	Spectres d'absorption UV-visible ³
MBP-Coq6 avec GroES GroEL	18 mg	Oligomère	10 mg 0,25 FAD	250 Oligo Tetra 150 100 37 25 20 15 10	0,06 0,05 0,04 0,04
		Tétramère	2 mg 0,8 FAD		0,02 0,01 0,00 0,00 0,01 0,01 0,01 0,01
MBP- Δ1-24Coq6 avec c GroES GroEL	28 mg	Oligomère	10 mg 0,2 FAD	250 Oligo Tétra 130 Hexa Mono 100 70 55 35 25	0,06 Oligomère
		Hexamère	5 mg 0,4 FAD		9 0,04 - Tétramère - Monomère
		Tétramère	4,5 mg 0,85 FAD		O,03 O,02
		Monomère	1,3 mg 0,85 FAD		0,01 0 300 350 400 450 500 550 600 650 700 Longueur d'onde (nm)

Tableau 9 : Comparaison des formes protéiques obtenues avec MBP-Coq6 et MBP-Δ1-24Coq6. 1. Quantité de protéine purifiée après la colonne MBP-trap pour un litre de culture. **2.** Quantité de protéine purifiée selon les différentes formes oligomériques pour un litre de culture, estimation de la quantité de FAD par monomère de protéine. **3.** Spectres d'absorption UV-visible des différentes formes oligomériques purifiées présentés de sorte que la densité optique à 280 nm soit d'environ 1.

III.2) Clivage du lien entre la MBP et Δ 1-24Coq6 par le facteur Xa

Une nouvelle tentative de clivage du linker entre la MBP et Δ1-24Coq6 par le facteur Xa est alors réalisée. Seule les formes tétramérique et monomérique de la protéine sont utilisées, la forme hexamérique possédant un faible taux de flavine (env. 40%) et la forme oligomérique étant fortement contaminée par la protéine absorbant à 420 nm et ne possédant qu'environ 20% de FAD.

A l'issue du clivage, cf. partie III.2.b.i du chapitre II page 52, la solution protéique est centrifugée. Contrairement à ce qui se passait pour MBP-Coq6, aucun précipité ne se forme et la protéine peut donc être concentrée. Le gel réalisé à l'issue du clivage permet de confirmer le clivage du linker entre la MBP et Δ 1-24Coq6 : il n'y a plus de bande vers 90 kDa (MBP- Δ 1-24Coq6, 93 kDa) et deux bandes sont apparues vers 40-50 kDa, cf. Figure 27A. On a donc bien obtenu deux protéines solubles : Δ 1-24Coq6 (51,5 kDa) et la MBP (42,5 kDa).

Afin de séparer ces deux protéines et de récupérer uniquement $\Delta 1$ -24Coq6, une colonne échangeuse d'anions (Uno Q) est réalisée, cf. partie III.2.b.ii du chapitre II page 52. La MBP ne s'accroche pas sur la colonne contrairement à $\Delta 1$ -24Coq6 qui est éluée vers 200 mM de NaCl, cf. Figure 27B. On constate la présence d'un pic bien défini (pic 1) suivi d'un épaulement (pic 2). Le pic 2 contient moins de flavine (env. 50%) que le pic 1 (env. 75%), cf. Figure 27C. Dans l'ensemble, on a un contenu en flavine légèrement plus faible qu'avec les monomère et tétramère de départ : il est possible que la protéine ait perdu une partie de sa flavine lors du clivage. Les pics 1 et 2 présentent une signature spectrale classique de flavoprotéine avec deux épaulements bien marqués vers 420 et 475 nm, ce qui signifie que le FAD est dans un environnement hydrophobe et donc bien lié à la protéine.



Figure 27 : Clivage de MBP-Δ1-24Coq6. A. Gel d'électrophorèse. Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MOPS. **B. Profil sur UnoQ à 450 nm du produit du clivage de MBP-Δ1-24Coq6.** Tampon Tris-HCl pH 7,5 150 mM.



Figure 27 : Clivage de MBP-Δ1-24Coq6. C. Spectres d'absorption UV-visible des pics 1 et 2 à l'issue de l'UnoQ. Tampon Tris-HCl pH 7,5 150 mM, NaCl 250 mM.

III.3) Comportement oligomérique de Δ 1-24Coq6

Dans un premier temps, les pics 1 et 2 ont été rassemblés. Une colonne d'exclusion stérique analytique réalisée sur un échantillon permet de constater qu'on est en présence d'un mélange de différentes formes oligomériques et notamment d'oligomères de grand poids moléculaire, cf. Figure 28A. En revanche, si on sélectionne uniquement le pic 1, on est en présence essentiellement d'un monomère. Ceci confirme les observations faites par spectroscopie d'absorption UV-visible : il est possible de constater, cf. Figure 27C, que le signal du pic 2 révèle une légère diffusion de la lumière, ce qui peut être révélateur d'un phénomène d'agrégation protéique en cours.

Ce résultat a été confirmé par une analyse SEC-MALS du pic 1 de l'UnoQ (C. Velours) à la plateforme Imagif du CNRS, cf. Figure 28B. Cette analyse se fait grâce à un système de chromatographie d'exclusion (SEC), ici une Superdex 200 10/300 Increase, couplé à un système de détection basé sur la diffusion de la lumière multi-angles (MALS), ici un miniDAWN TREOS (Wyatt). La diffusion de la lumière multi-angles permet de déterminer de façon précise la masse moléculaire d'une protéine, indépendamment de son rayon hydrodynamique. Deux pics principaux sont détectés : le premier est associé à une masse moléculaire de 90 kDa, ce qui correspond à une forme dimérique de la protéine, et le second est associé à une masse moléculaire de 47 kDa, ce qui correspond à une forme monomérique de Δ 1-24Coq6.



Figure 28 : Etude de l'état d'oligomérisation de Δ1-24Coq6 à l'issue de l'UnoQ. Tampon Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 5%. A. Profil d'élution sur Superdex 200 10/300 de la protéine issue de l'UnoQ : pic 1 et mélange. B. Résultat d'analyse SEC-MALLS sur Δ1-24Coq6 contenue dans le pic 1 issue de l'UnoQ. Colonne Superdex 200 10/300 Increase.

Nous avons donc réussi, grâce à l'élimination de la séquence d'adressage à la mitochondrie, à purifier Coq6 sous forme soluble et essentiellement monomérique avec 0,75 FAD par monomère et un rendement de 0,5 à 1 mg par litre de culture.

Les formes de Coq6 de *S. cerevisiæ* utilisées par la suite sont la forme oligomérique de MBP-Coq6, la forme tétramérique de MBP-Coq6 et la forme monomérique issue de l'UnoQ après le clivage de MBP- Δ 1-24Coq6. Les différentes formes protéiques obtenues lors des différentes purifications des différentes formes de Coq6 de *S. cerevisiæ* sont présentées dans le Tableau 10 ciaprès. On remarque que la forme monomérique Δ 1-24Coq6 est celle qui présente le spectre d'absorption UV-visible le plus cohérent avec un bon positionnement du FAD dans la protéine. La présence de l'épaulement à 475 nm est révélateur d'un environnement hydrophobe pour le FAD et donc signe que celui-ci est bien lié.

Protéine	post- MBP ¹	Formes purifiées ²		Gel	Spectres d'absorption UV-visible ³	
MBP-Coq6 sans GroES GroEL	1,8 mg	Oligomère	0,3 mg 0,15 FAD	Oligo Tétra Mono 185 115 80 65 50 30 25 15	Densité optique	0,035 0,03 0,025 Oligomère Monomère
		Tétramère	0,2 mg 0,25 FAD			0,02 0,015
		Monomère	0,03 mg 0,27 FAD			0,01 0,005 0 300 350 400 450 500 550 600 650 700 Lonaueur d'onde (nm)
MBP-Coq6 avec GroES GroEL	18 mg	Oligomère	10 mg 0,25 FAD	250 Oligo Tétra 150 100 75 50 37	sité optique	0,06 0,05 0,04 0,03
		Tétramère	2 mg 0,8 FAD	20 15 10	Den	0,02 0,01 0 300 350 400 450 500 550 600 650 700 Longueur d'onde (nm)
MBP- Δ1-24Coq6 avec c GroES GroEL	28 mg	Oligomère	10 mg 0,2 FAD	250 Oligo Tétra 130 Hexa Mono 100 70 55		0,06 0,05 Oligomère Hexamère
		Hexamère	5 mg 0,4 FAD		é optique	0,04 0,03
		Tétramère	4,5 mg 0,85 FAD		Densit	0,02
	\Box	Monomère 1,3 mg 0,85 FAD	25		0 i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	
Δ1-24Coq6 issue de MBP- Δ1-24Coq6		Monomère (maj.)	1 mg 0,75 FAD	Mono 115 80 65 50 30 25	Densité optique	0,12 0,1 0,08 0,06 0,04 0,02 0,00 350 400 450 500 550 600 650 700 Longueur d'onde (nm)

Tableau 10 : Formes protéiques de Coq6 de S. cerevisiæ purifiées. 1. Quantité de protéine purifiée après la colonne MBP-trap pour un litre de culture. 2. Quantité de protéine purifiée selon les différentes formes oligomériques pour un litre de culture, estimation de la quantité de FAD par monomère de protéine.
Spectres d'absorption UV-visible des différentes formes oligomériques purifiées présentés de sorte que la densité optique à 280 nm soit d'environ 1. A noter que Δ1-24Coq6 ne possède plus de MBP, d'où un rapport 280/450 plus faible.

IV) Caractérisation de la flavine de Coq6

La présence de FAD dans MBP-Coq6 et ∆1-24Coq6 a été confirmée par HPLC en utilisant la méthode décrite dans la partie III.3.c.i du chapitre II page 56. Le coefficient d'extinction molaire du FAD lié dans la protéine déterminé par spectroscopie UV-visible est de de 11,5 mM⁻¹cm⁻¹ à 450 nm (cf. partie III.3.c.ii du chapitre II page 56).

Coq6

IV.1) Titration de la flavine par le dithionite

Afin de connaître la signature spectroscopique de Δ1-24Coq6 sous formes oxydée et réduite, une titration par le dithionite a été réalisée en boîte à gants sur la forme monomérique en suivant la méthode décrite dans la partie III.3.d du chapitre II page 57.

On constate que le FAD contenu dans Δ 1-24Coq6 est totalement réduit par le dithionite, cf. Figure 29. La bande à 450 nm disparaît totalement. Un équivalent de dithionite suffit pour réduire totalement le FAD contenu dans la protéine en FADH₂. Lorsque l'échantillon est exposé à l'oxygène de l'air, le FAD est entièrement réoxydé.



Figure 29 : Titration de la flavine de Coq6 par le dithionite en anaérobiose. A. Spectres d'absorption UV-visibles du pic 1 de Δ1-24Coq6 avec différentes proportions de dithionite. FAD lié à MBP-Coq6 tétramère 10 μM, volume initial de 100 μL, ajout total de 18 μL de dithionite à 102 μM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 10 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus. B. Proportion de FAD du pic 1 de Δ1-24Coq6 réduite en fonction du nombre d'équivalents de dithionite ajoutés.

IV.2) Absence de réduction directe par le NADPH et le NADH

Coq6 de *S. cerevisiæ* étant une supposée monooxygénase à flavine de classe A selon Van Berkel *et al.* 2006, son réducteur naturel est soit le NADH, soit le NADPH. En effet, même si la réduction en anaérobiose par le NADH ou le NADPH est plus lente en absence de substrat pour cette classe de monooxygénase, elle devrait rester possible (Howell *et al.* 1972, Katagiri *et* Takemori 1973). Des tentatives de réduction du FAD de la forme tétramérique de MBP-Coq6 et de la forme monomérique de Δ 1-24Coq6 par le NADPH ou le NADH ont été menées en anaérobiose, en allant jusqu'à 150 à 200 éq de réducteur. Dans tous les cas, il n'y a pas de réduction de la flavine, cf. Figure 30 l'exemple de Δ 1-24Coq6 en présence de 50 éq de NADPH.



Figure 30 : Essai de réduction de Δ1-24Coq6 par le NADPH. FAD lié à Δ1-24Coq6 10 μM, NADPH 500 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. Spectre bleu enregistré 60 min après l'ajout de NADPH.

Cette absence de réduction de Coq6 par le NADPH ou le NADH, y compris sur une forme sans MBP, tend à conforter l'hypothèse d'une source d'électrons inhabituelle pour une monooxygénase de classe A et à la nécessité de la présence de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine (Pierrel *et al.* 2010, Ozeir *et al.* 2011).

Parmi les nombreuses monooxygénases appartenant à cette classe, seuls deux exemples d'époxydases ne recevant pas directement leurs électrons du NADH ou du NADPH sont connus à ce jour et ont été étudiés. Ainsi, *in vitro*, la zéaxanthine époxydase de poivre nécessite la présence des ferrédoxine réductase et ferrédoxine d'épinard (système hétérologue) pour être réduite et époxyder son substrat, la zéaxanthine (Bouvier *et al.* 1996). La squalène époxydase humaine, quant à elle nécessite la NADPH-cytochrome P450 réductase pour fonctionner (Laden *et al.* 2000). Des études ultérieures sur des mutants de souris tendent à montrer qu'elle peut également recevoir ses électrons d'une autre protéine encore non identifiée (Li *et* Porter 2007).

Ainsi, Coq6 pourrait être la troisième protéine appartenant à cette sous-famille de la classe A. Il est intéressant de noter que la zéaxanthine et le squalène possèdent tous les deux une chaîne grasse composée d'unités isoprénoïdes insaturées tout comme le substrat de Coq6, cf. Schéma 23. De plus, ces deux enzymes se situent à proximité d'une membrane cellulaire, tout comme Coq6.



Schéma 23 : Substrats de Coq6, de la zéaxanthine époxydase et de la squalène époxydase. Les cercles rouges indiquent la position de l'hydroxylation ou de l'époxydation réalisée.

V) Cristallographie et modèle bioinformatique

Afin d'accéder à une structure 3D de la protéine et d'approfondir la compréhension du fonctionnement de Coq6 de *S. cerevisiæ*, des essais de cristallographie et la réalisation d'un modèle moléculaire ont été menés au laboratoire.

V.1) Cristaux de MBP-Coq6

Dans un premier temps, des essais de cristallisation de la forme tétramérique de MBP-Coq6 ont été menés (M. Lombard). Ils ont permis d'obtenir des cristaux, cf. Figure 31A, qui ont été soumis à un faisceau de rayons X au synchrotron SOLEIL sur la ligne de lumière PROXIMA 1, spécifique à l'analyse des cristaux de macromolécules. Un jeu de données avec une résolution de 5 Å a pu être obtenu, cf. Figure 31B.

Cependant, la structure n'a pas encore pu être résolue (L. Pecqueur). Tout d'abord, la faible résolution obtenue (5 Å) associée à une très grande taille de la maille et donc un grand nombre de molécules par unité asymétrique rendent la résolution de la structure difficile. De plus, la phase du signal n'a pu être déterminée par remplacement moléculaire. En effet, s'il existe déjà des structures résolues concernant la partie MBP, Coq6 de *S. cerevisiæ* ne possède pas assez d'identité de séquence avec d'autres protéines cristallisées. La méthode par remplacement moléculaire nécessite une identité de séquence supérieure à 30%. Ubil, homologue fonctionnel de Coq6 chez *E. coli* a certes été cristallisée et sa structure résolue au laboratoire (Hajj Chehad *et al.* 2013) mais elle ne possède que 28% d'identité de séquence avec celle-ci, ce qui n'est au final pas suffisant.

Une solution pour déterminer la phase du signal serait d'obtenir MBP-Coq6 avec des sélénométhionines à la place des méthionines en la surexprimant en milieu minimum avec de la sélénométhionine. Ainsi, les atomes de sélénium, plus denses que les atomes de soufre, formeraient un réseau plus simple à résoudre, ce qui permettrait de retrouver la phase du signal des données obtenues avec la protéine sans sélénométhionines.

Des essais de surexpression de Coq6 privée de la séquence d'adressage à la mitochondrie comprenant un tag polyhistidine en absence du tag MBP sont en cours dans le but, à terme, d'obtenir une protéine monomérique en grandes quantités qui pourra être soumise à des essais de cristallisation.



Figure 31 : A. Cristaux de MBP-Coq6. Phosphate d'ammonium 200 mM, Tris-HCl pH 8,5 100 mM , 2-méthyl-2,4-pentanediol 50% (v/v), MBP-Coq6 tétramère 26 mg/mL. B. Projection selon l des clichés de diffraction obtenus.

V.2) Construction et étude d'un modèle bioinformatique par homologie de Coq6 de *S. cerevisiæ*

En parallèle de ces travaux de cristallographie, trois modèles bioinformatiques de Coq6 de *S. cerevisiæ* ont été réalisés (A. Ismail). Ces modèles ont été réalisés soit de façon entièrement automatique avec deux serveurs reconnus, ROSETTA et ITASSER, soit avec une intervention poussée du modélisateur à l'aide du logiciel MODELLER. Ces différents modèles sont basés sur les structures de Ubil, homologue fonctionnel de Coq6 chez *E. coli* (code PDB 4K22, 28% d'identité de séquence avec Coq6 de *S. cerevisiæ*), d'un homologue de Ubil chez *Erwina carotovora* (code PDB 4NX9, 23% d'identité de séquence avec Coq6 de *S. cerevisiæ*), de la quinolone oxydase de *Pseudomonas aeruginosa* (PqsL, code PDB 2X3N, 19% d'identité de séquence avec Coq6 de *S. cerevisiæ*) et de la pHBH, para-hydroxybenzoate hydroxylase de *Pseudomonas fluorescens*, (code PDB 1PBE, 15% d'identité de séquence avec Coq6 de *S. cerevisiæ*), ces deux dernières structures

ayant été obtenues avec le FAD incorporé. Les séquences peptidiques de ces enzymes ainsi que celle de Coq6 sont présentées dans l'alignement de séquence de la Figure 17 page 86.

Un travail de docking du FAD, conforté par dynamique moléculaire, a été réalisé sur ces trois modèles. Il s'est avéré que si les trois modèles étaient stables, un seul permettait de réaliser un travail de docking cohérent avec les substrats potentiels : le modèle réalisé à partir du logiciel MODELLER, cf. Figure 32. Sur cette représentation, les acides aminés homologues à ceux impliqués dans les mutations ponctuelles trouvées chez l'homme et liées à des maladies génétiques ont été mis en évidence : K155, G248 et A361 de Coq6 de *S. cerevisiæ* correspondant aux mutations R162X, G255R et A353D chez l'homme (Heeringa *et al.* 2011); D201 pour D208H reportée par Zhang *et al.* (2014) et enfin F420 correspondant à la mutation Y412C reportée chez l'homme par Doimo *et al.* (2014). On remarquera que le résidu D201 fait partie des résidus clefs de liaison au FAD chez les monooxygénases à flavine de classe A, cf. Figure 17 page 86.



Figure 32 : Représentation en ruban de Coq6 de *S. cerevisiæ* avec les positions correspondant aux résidus mutés reportés dans des pathologies humaines.

Le docking du FAD dans ce modèle, cf. Figure 33, permet d'identifier les résidus en interaction avec celui-ci et de constater qu'on a une poche de liaison du FAD typique des monooxygénases à flavine : on remarque les aspartates 201 et 374 appartenant aux motifs de reconnaissance du FAD des monooxygénases de classe A. A l'exception de la méthionine 62 et de la phénylalanine 203, l'ensemble des résidus mis en évidence est présent dans la famille Coq6.



Figure 33 : Cavité de liaison au FAD selon le modèle MODELLER. L'adénine du FAD est en interaction avec Coq6 *via* une liaison hydrogène entre son azote et la valine 167 ainsi que par des interactions π-soufre avec la méthionine 62 et π-anion avec l'aspartate 201. Le ribose suivant l'adénine du FAD possède une liaison hydrogène avec l'aspartate 61. Le pyrophosphate, quant à lui, possède de nombreuses liaisons hydrogène avec l'arginine 83, l'asparagine 204 et l'azote de la liaison amide entre la phénylalanine 203 et l'asparagine 204. La chaîne rybityle reliant le pyrophosphate au noyau isoalloxazine forme une liaison hydrogène avec l'aspartate 374. Le noyau isoalloxazine est en interaction π-π avec la phénylalanine 354.

La cavité à proximité du noyau isoalloxazine, censée être le siège de l'hydroxylation, a été comparée à celle de la pHBH, cf. Figure 34. En effet, la pHBH a été cristallisée avec son cofacteur FAD et son substrat (pHB), un noyau aromatique similaire à un des substrats proposés de Coq6, l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque, HHB. Cependant, en se basant sur des études *in vivo* menées sur une souche de levure modifiée ne possédant pas le gène codant pour Coq6, on peut également proposer l'hexaprénylhydroquinone, HHQ, (Ozeir *et al.* 2011), cf. Schéma 24 et la partie III.1.b du chapitre I page 33 pour plus de précisions.



Schéma 24 : Structures moléculaires de substrats proposés de Coq6.

De façon intéressante, il s'avère que l'arginine (R214) permettant la stabilisation du carboxylate de l'hydroxybenzoate chez la pHBH est remplacée par une méthionine (M255) chez Coq6, acide aminé ne permettant pas une telle interaction. Cette constatation tend à conforter l'hypothèse de HHQ et non HHB comme substrat de Coq6.



Figure 34 : Comparaison du site actif issu de la structure cristalline de pHBH et la même région dans le modèle de Coq6 de *S. cerevisiæ* (MODELLER), noyau isoalloxazine du FAD en vert. A. pHBH B. Coq6.

Trois canaux d'accès du substrat au site actif, situé à proximité du noyau isoalloxazine du FAD, ont été identifiés. Des essais de docking dans ces différents canaux ont montré que le HHQ adoptait des conformations plus cohérentes que le HHB et ce, dans un seul des canaux. La tête aromatique de HHQ est alors proche du noyau isoalloxazine et ses deux hydroxyles sont en interaction respectivement avec la tyrosine 261 et la proline 381. La chaîne isoprényle est quant à elle maintenue en place par la poche formée par le canal d'accès. Par ailleurs, ce canal est conservé dans la famille des Coq6 et il a été mis en lien avec une mutation ponctuelle (G255R chez l'homme correspondant à G248R chez *S. cerevisiæ*) présente chez l'homme et liée à une déficience en ubiquinone qui est associée à un syndrome néphrotique cortico-résistant et une surdité neuro-sensorielle (Heeringa *et al.* 2011). L'arginine remplaçant la glycine obstruerait le canal, ce qui pourrait expliquer la déficience en ubiquinone et ses conséquences, cf. Figure 35.



Figure 35 : Site actif du modèle de Coq6 G248R (MODELLER) avec FAD et substrat dockés. En vert, le noyau isoalloxazine du FAD. En mauve, canal d'accès supposé du substrat avec substrat potentiel docké en bleu, l'hexaprénylehydroquinone. En jaune, la mutation (glycine en arginine) probablement à l'origine d'une obstruction partielle du canal.

La modélisation de Coq6 de *S. cerevisiæ* a donc permis de visualiser la structure de la protéine et de proposer un site de liaison au FAD ainsi qu'un canal d'accès du substrat à la cavité siège de la réactivité de la protéine qui sert aussi de poche pour maintenir la chaîne grasse du substrat en place. Par ailleurs, l'hypothèse de l'hexaprénylhydroquinone comme substrat de Coq6 plutôt que l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque est soulevée. Enfin, l'origine du dysfonctionnement de la biosynthèse de l'ubiquinone chez certains patients dû à des mutations ponctuelles a pu être liée à la position de l'acide aminé muté sur la protéine : D208H participe à la liaison au FAD et G255R serait situé au niveau d'un canal d'accès du substrat au site actif.

VI) Conclusion

Un travail d'optimisation des conditions de surexpression et de purification de Coq6 de *S. cerevisiæ* nous a permis d'obtenir pour la première fois la protéine sous forme soluble et monomérique avec son cofacteur (0,75 FAD par monomère). Ceci a nécessité la surexpression de la protéine en présence des chaperonnes GroES et GroEL ainsi que la suppression des 24 premiers acides aminés de la forme native, correspondant à la séquence d'adressage à la mitochondrie (Claros *et* Vincent 1996, Gin *et al.* 2003).

De façon inhabituelle pour une monooxygénase à flavine de classe A, nous n'avons pas pu réduire directement le FAD de Coq6 de *S. cerevisiæ* par le NADPH ou le NADH. Les résultats d'études *in vivo* menées par nos collaborateurs (Pierrel *et al.* 2010, Ozeir *et al.* 2011) nous ont donc conduits à nous intéresser à l'adrénodoxine et à l'adrénodoxine réductase comme source d'électrons pour la réduction de Coq6 de *S. cerevisiæ*. L'hypothèse serait une chaîne de transfert d'électrons menant du NAD(P)H à Coq6 *via* l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine.

Coq6 ne serait pas la seule enzyme à avoir ce comportement particulier dans la famille des monooxygénases à flavine de classe A : on peut citer la zéaxanthine époxydase de poivre qui peut recevoir ses électrons *in vitro via* la ferrédoxine réductase et la ferrédoxine d'épinard (Bouvier *et al.* 1996) ainsi que la squalène époxydase humaine qui reçoit ses électrons de la NADPH-cytochrome P450 réductase pour fonctionner (Laden *et al.* 2000).

Les études structurales commencées au laboratoire ont d'ores et déjà permis d'obtenir des cristaux de la forme tétramérique de MBP-Coq6. La faible résolution des clichés de diffraction enregistrés (5 Å) couplée au nombre élevé de molécules par unité asymétrique n'ont néanmoins pas permis la résolution de sa structure jusqu'à présent. Des constructions de Δ 1-24Coq6 avec un tag histidine sont en cours d'élaboration dans le but d'obtenir une protéine monomérique en grandes quantités pouvant cristalliser.

L'élaboration d'un modèle structural par homologie nous a néanmoins permis de proposer un site de liaison du FAD. Par ailleurs, des analyses du modèle ont permis de déterminer un canal d'accès du substrat au site actif et de soulever l'hypothèse de l'hexaprénylhydroquinone plutôt que de l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque comme substrat de Coq6. Enfin, l'origine du dysfonctionnement de la biosynthèse de l'ubiquinone chez certains patients dû à la mutation ponctuelle G255R pourrait être liée à l'obstruction d'un canal d'accès du substrat au site actif.

CHAPITRE IV : Mise en évidence d'une chaîne de transfert d'électrons à Coq6

I) Introduction

Par homologie de séquence, cf. Figure 17 page 86, Coq6 est classée parmi les monooxygénases de classe A : elle possède les trois motifs caractéristiques de liaison au FAD de cette classe (GxGxxG, GD et DG). Par ailleurs, la surexpression et la purification de Coq6 nous a permis de confirmer la présence du FAD comme cofacteur de forte affinité, ce qui conforte l'hypothèse d'une monooxygénase à un composant. Le mécanisme de la *para*-hydroxybenzoate hydroxylase, enzyme canonique de la classe A, est présenté Schéma 11 page 31.

Il ne nous a pas été possible de réduire directement le FAD de Coq6 par le NADH ou le NADPH, ce qui n'est pas courant pour une monooxygénase de cette classe. Des résultats d'études *in vivo* menées par nos collaborateurs (Pierrel *et al.* 2010, Ozeir *et al.* 2011) montrent qu'une souche de *S. cerevisiæ* mutante KO de l'adrénodoxine réductase ou de l'adrénodoxine présentent le même phénotype qu'une souche mutante KO de Coq6, c'est-à-dire l'accumulation d'hexaprényl-hydroquinone HHQ.

Jusqu'à présent, l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* étaient surtout connues pour être impliquées dans la biosynthèse des centres Fe-S (Lange *et al.* 2000, Li *et al.* 2001, Webert *et al.* 2014) et celle de l'hème A (cofacteur essentiel de la cytochrome c oxydase (Barros *et al.* 2002).

Dans notre cas, l'implication de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* dans une chaîne de transfert d'électrons menant du NAD(P)H à une monooxygénase à flavine de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, Coq6, est postulée pour la première fois. C'est pourquoi il nous a paru essentiel de produire et purifier ces deux enzymes afin d'étudier leur éventuelle implication dans l'activité enzymatique de Coq6 mais également le transfert d'électrons entre ces trois protéines.

II) Caractérisation biochimique de l'adrénodoxine réductase humaine, hAdR

L'adrénodoxine réductase de levure, désignée par ScAdR dans ce manuscrit, est difficile à surexprimer et purifier : la seule purification décrite jusqu'à présent a été faite avec une protéine de fusion comportant un tag GST (glutathion S-transférase) à l'extrémité N-terminale (Lacour *et al.* 1998). Après clivage du tag, les auteurs font état d'un mélange de 15% de ScAdR avec 85% de GroEL et au final un rendement en protéine active inférieur à 0,1 mg par litre de culture. Au laboratoire, nous avons tenté de purifier ScAdR avec un tag poly-histidines à l'extrémité N-

terminale. Le plasmide pETDuet-1 nous a été fourni par U. Mühlenhoff de l'Institut für *Zytobiologie* und Zytopathologie de l'Université Philipps de Marbourg. Cependant, la protéine forme des corps d'inclusion et n'est pratiquement pas présente dans les extraits solubles malgré différentes conditions de surexpression testées (température, chaperonnes, IPTG, etc.). Une lyse cellulaire en présence d'un détergent nous a permis d'obtenir ScAdR dans la fraction soluble mais il s'est avéré qu'elle ne possédait pas de cofacteur flavinique.

Nous avons donc décidé de travailler avec l'homologue humain de ScAdR, l'adrénodoxine réductase humaine, désignée par hAdR dans ce manuscrit. En effet, même si la complémentation *in vivo* n'a pas été prouvée (Manzella *et al.* 1998), l'adrénodoxine réductase humaine est capable de remplacer l'adrénodoxine réductase de levure *in vitro* et de transférer les électrons du NADPH à l'adrénodoxine de levure (Sheftel *et al.* 2010, Webert *et al.* 2014). Nous avons donc purifié l'adrénodoxine réductase privée de sa séquence d'adressage à la mitochondrie (32 premiers acides aminés) et dotée d'un tag poly-histidines à l'extrémité N-terminale (plasmide pETDuet-1, également fourni par U. Mühlenhoff). A noter que la première purification de l'adrénodoxine réductase humaine a été réalisée en 1992 par Brandt *et* Vickery avec un plasmide p∆blue et un rendement en protéine active de 0,1 mg par litre de culture. Notre but était donc d'améliorer le rendement de purification de hAdR afin de pouvoir réaliser les études ultérieures de biochimie.

II.1) Optimisation de la surexpression de l'adrénodoxine réductase humaine, hAdR

Dans un premier temps, une optimisation des conditions de culture a été réalisée afin d'obtenir le maximum de hAdR dans la fraction soluble. Comme la détection de hAdR sur gel SDS était très faible, la surexpression a été visualisée par Western Blot avec un anticorps primaire antitag6his (cf. partie III.1.c du chapitre II page 49).

II.1.a) Influence de la température de culture

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la température d'induction. Lorsque la culture se fait à 37°C, la protéine forme des corps d'inclusion et n'est pas présente dans les extraits solubles. Une température de culture plus faible, 20°C, a été choisie pour permettre une meilleure solubilité de la protéine.

II.1.b) Influence du moment d'induction

L'influence du moment d'induction de l'adrénodoxine réductase par ajout d'IPTG a été étudiée par la suite avec des souches BL21 (DE3), cf. Figure 36.



Figure 36 : Influence de la DO d'induction sur la production de l'adrénodoxine réductase. En arrière-plan, gel d'électrophorèse coloré au SYPRO Orange et visualisé en UV, en rouge, signal de chimilumescence du luminol proportionnel à la quantité de l'adrénodoxine réductase taguée 6-his détecté par caméra CCD. t_{ind}, cellules au temps d'induction, t_{réc}, cellules entières, C, culot, S, surnageant.

Lorsqu'on induit l'expression de hAdR à $DO_{600 nm} = 0,8-1$, en milieu de phase de croissance exponentielle, on n'observe pas de protéine dans les extraits solubles (ou surnageant) alors qu'en induisant son expression vers $DO_{600 nm} = 1,7-1,8$, à la fin de la phase exponentielle de croissance, la proportion d'adrénodoxine réductase humaine dans le surnageant est plus importante. Cette différence est probablement due au fait que les bactéries en fin de phase de croissance exponentielle expriment diverses chaperonnes en quantité plus importante que des bactéries en début de phase de croissance exponentielle. La protéine produite se replie mieux et forme moins de corps d'inclusion.

L'induction se fera donc désormais à DO_{600 nm}=1,7-1,8. Cependant, on constate qu'il n'y a pas une surexpression très importante de la protéine. Cela peut venir du fait que la séquence génétique de l'adrénodoxine réductase n'a pas été optimisée pour être exprimée dans la bactérie. En effet, la séquence contient des codons « rares » chez *E. coli* : la bactérie ne possède pas beaucoup de copies des ARN de transfert leur correspondant et cela peut ralentir la production de la protéine.

Nous avons donc décidé de surexprimer la protéine dans des souches contenant plusieurs copies de gènes codant pour les ARNt rares chez *E. coli* afin de voir si nous ne pouvions pas améliorer le taux d'adrénodoxine réductase soluble.

II.1.c) Influence de la souche bactérienne choisie

Nous avons testé des souches RosettaBlue, Rosetta 2 et BL21 CodonPlus(DE3)-RIL contenant plusieurs copies de gènes codant pour des ARNt rares de *E. coli*. Les résultats de ces différents tests sont visibles Figure 36 et Figure 37 et résumés dans le Tableau 11.

Au niveau de la surexpression d'adrénodoxine réductase, on constate que la souche BL21 CodonPlus (DE3)-RIL est la plus performante. En effet, c'est elle qui possède le signal de chimioluminescence associé à l'adrénodoxine réductase le plus important dans les cellules entières. Cependant, elle se retrouve essentiellement sous forme de corps d'inclusion. La souche RosettaBlue conduit exclusivement à la formation de corps d'inclusion. Quant à la souche Rosetta 2, elle surexprime peu l'adrénodoxine réductase et il y a peu de protéine soluble.



Figure 37 : Influence de la souche d'expression sur la production d'adrénodoxine réductase. En arrièreplan, gel d'électrophorèse coloré au SYPRO Orange et visualisé en UV, en rouge, signal de chimilumescence du luminol proportionnel à la quantité d'adrénodoxine réductase taguée 6-his détecté par caméra CCD. t_{ind}, cellules au temps d'induction, t_{réc}, cellules récoltées, C, culot, S, surnageant.

Souche utilisée	Surexpression	Proportion d'hAdR dans le surnageant
RosettaBlue	+++	-
Rosetta 2	+	+
BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	+++	+
BL21 (DE3)	++	++

Tableau 11 : Résumé des résultats concernant la souche optimal de surexpression de huAh1.

Les souches possédant les codons rares n'améliorant pas la proportion d'adrénodoxine réductase dans le surnageant protéique, nous les avons donc écartées et avons poursuivi notre travail d'optimisation sur des souches BL21 (DE3).

II.1.d) Influence de la présence de chaperonnes

Nous avons voulu voir si la co-expression de chaperonnes avec la protéine pouvait améliorer sa solubilité. Nous avons constaté que, dans une souche BL21 (DE3), l'expression des chaperonnes GroES et GroEL permettait d'obtenir un taux d'expression de hAdR soluble légèrement meilleur qu'avec une souche BL21 (DE3) n'exprimant pas de chaperonnes. Nous avons donc décidé de réaliser les cultures destinées à la purification de la protéine en surexprimant ces chaperonnes. Ce choix est conforté par le fait que l'adrénodoxine réductase de bœuf se purifie plus facilement en présence des mêmes chaperonnes, Vonrhein *et al.* 1999.

II.2) Purification de l'adrénodoxine réductase humaine

La protéine ayant un tag poly-histidines à son extrémité N-terminale, une purification classique est mise en place : une colonne d'affinité suivie d'une colonne d'exclusion stérique, cf. partie III.2.c du chapitre II page 53.

II.2.a) Colonne Ni Sepharose

Après la lyse cellulaire, une fois les extraits solubles purifiés sur colonne Ni-Sépharose, la protéine est éluée par un gradient d'imidazole. On réalise un spectre d'absorption UV-visible des fractions en sortie de Ni Sepharose, cf. Figure 38A : elles possèdent toutes, sauf la dernière, les deux bandes caractéristiques des flavoprotéines à 370 nm et 450 nm. Le rapport DO_{280 nm}/DO_{450 nm} permet d'évaluer rapidement la teneur en flavine de la protéine contenue dans les fractions et on sélectionne celles dont le rapport est inférieur à 16. On constate sur gel qu'une grande proportion de GroEL (60 kDa) a été éluée avec hAdR (51,7 kDa), cf. Figure 38B.



Figure 38 : Analyse des fractions à l'issue de la Ni Sepharose. A. Spectres d'absorption UV-visible des fractions issues de la Ni Sepharose en fonction de la concentration en imidazole. B. Gel d'électrophorèse des fractions issues de la Ni Sepharose. Gel 8% acrylamide, tampon Tris-Glycine-SDS.

II.2.b) Colonne d'exclusion stérique

La colonne d'exclusion stérique Superdex 75 16/60 est une colonne préparative séparant les protéines ayant une taille située entre 3 et 70 kDa. Ici, elle va nous permettre de récupérer uniquement hAdR en la séparant de GroEL, cf. Figure 39A. GroEL est éluée à V_e = 47 mL, ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 70 kDa d'après la calibration de la colonne réalisée

avec des standards de poids moléculaire connu, cf. Figure 39B. Il semble donc que GroEL soit monomérique. L'adrénodoxine réductase est éluée à V_e = 55 mL, ce qui, d'après la courbe de calibration correspond à une protéine d'environ 50 kDa. Une expérience de SEC-MALLS (C. Velours) a permis de confirmer que hAdR est monomérique (masse moléculaire obtenue de 50,3 kDa). L'analyse des fractions sur gel vient confirmer la présence de GroEL dans le premier pic et celle de l'adrénodoxine réductase dans le deuxième pic. Les fractions ayant un rapport DO_{280 nm}/DO_{450 nm} inférieur à 8 sont rassemblées et concentrées : on obtient une protéine avec un rapport DO_{280 nm}/DO_{450 nm} de 7,2, cf. Figure 39C et D.



Figure 39 : Purification de l'adrénodoxine réductase sur Superdex 75 16/60. Tampon tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 100 mM, Glycérol 5% **A. Profil d'élution de l'adrénodoxine réductase sur Superdex 75 16/60. B. Courbe de calibration de la Superdex 75 16/60.** V_e volume d'élution de la protéine d'intérêt, V_t volume total de la colonne, V₀ volume mort de la colonne. C. **Gel d'électrophorèse de la protéine purifiée à l'issue de la Superdex 75 16/60.** Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MOPS. D. **Spectre d'absorption UV-visible de hAdR.** FAD lié à hAdR 7,5 μM.

II.3) Caractérisation de la flavine de l'adrénodoxine réductase humaine

II.3.a) Nature et taux de flavine

Grâce à la méthode décrite dans la partie III.3.c.i du chapitre II page 56, il a été déterminé que le cofacteur contenu dans l'adrénodoxine réductase est bien du FAD. Le coefficient d'extinction molaire de FAD contenu dans la protéine est de 11 mM⁻¹.cm⁻¹ à 450 nm et il y a 0,7 molécule de FAD par monomère de l'adrénodoxine réductase selon la méthode de dosage par spectroscopie d'absorption UV-visible décrite dans la partie III.3.C.ii du chapitre II page 56.

II.3.b) Titration de la flavine par le dithionite, le NADPH et le NADH

Le comportement oxydo-réducteur du FAD de l'adrénodoxine réductase a été étudié en anaérobiose. L'adrénodoxine réductase a été titrée par différents réducteurs en utilisant la méthode décrite dans la partie III.3.d du chapitre II page 57. Le nombre d'équivalents en réducteur a été calculé en se basant sur la concentration de FAD dans la protéine avec $\epsilon_{450 nm}$ (FAD_{hAdR})= 11 mM⁻¹.cm⁻¹.

La titration a d'abord été réalisée à l'aide d'un réducteur chimique, le dithionite. Le FAD contenu dans l'adrénodoxine réductase est totalement réduit : la bande à 450 nm disparaît totalement, cf. Figure 40. Il faut un équivalent de dithionite pour réduire entièrement le FAD de hAdR en FADH₂.



Figure 40 : Titration de l'adrénodoxine réductase par le dithionite. A. Spectres d'absorption UV-visible de l'adrénodoxine réductase avec différents équivalents de dithionite. FAD lié à hAdR 23 μM, volume initial de 100 μL, ajout total de 23,5 μL de dithionite à 179 μM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 10 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus. **B. Pourcentage de FAD de l'adrénodoxine réductase réduit en fonction du nombre d'équivalents de dithionite.** DO_f est prise pour 1,02 équivalents de dithionite.

L'adrénodoxine réductase humaine posséde 89% d'identité de séquence avec l'adrénodoxine réductase bovine qui a comme réducteur naturel le NADPH (Chu et Kimura 1973a). Une titration de hAdR par le NADPH a donc été réalisée, cf. Figure 41.



Figure 41 : Titration de l'adrénodoxine réductase par le NADPH. A. Spectres d'absorption UV-visible de l'adrénodoxine réductase avec différents équivalents de NADPH. FAD lié à hAdR 13 μM, volume initial de 250 μL, ajout total de 37,5 μL de NADPH à 128 μM puis 25 μL à 12,8 mM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 3 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus. **B. Pourcentage de FAD de l'adrénodoxine réductase réduit en fonction du nombre d'équivalents de NADPH.** DO_f théorique calculée d'après la titration avec le dithionite.

On constate que le FAD est réduit de façon constante et régulière par le NADPH jusqu'à atteindre un plateau, lorsque 85% du FAD est sous forme FADH₂. Lorsqu'on est en présence d'un léger excès de NADPH (1,6 équivalents, courbe bleue), on observe une augmentation de l'absorbance entre 500 et 800 nm, caractéristique d'un complexe de transfert de charge entre le FAD de la protéine et le NADPH appelé CT1 (Lambeth *et* Kamin 1976). La signature en spectroscopie UV-visible du CT1 bAdR-FAD : NADPH de l'adrénodoxine réductase de bœuf (bAdR) est présentée Figure 42.

Quand on ajoute un large excès de NADPH (100 équivalents, courbe rouge en pointillés), on voit apparaître la forme neutre semiquinone du FAD, FADH⁻, avec des bandes caractéristiques vers 500 nm et 575 nm. En effet, le FAD possède trois états d'oxydo-réduction sous différentes formes de protonation, cf. Schéma 25, Müller 1987. Les deux formes de semiquinone n'ont pas la même signature spectrale : la semiquinone neutre est bleue avec des bandes d'absorption caractéristiques à 500 et 575 nm et la semiquinone anionique est rouge avec des bandes d'absorption caractéristiques à 400 et 485 nm. Les signatures en spectroscopie UV-visible des deux formes de semiquinone du FAD de la glucose oxydase sont présentées Figure 42.



Schéma 25 : Etats d'oxydo-réduction possibles du noyau isoalloxazine du FAD.



Figure 42 : Signatures en spectroscopie UV-visible des deux formes de semiquinone sur l'exemple de la glucose oxidase et du CT1 FAD : NADPH sur l'exemple de l'adrénodoxine réductase de bœuf. Adapté de Massey et Ghisla 1974 et de Nonaka et al. 1985.

La formation et la stabilisation d'un complexe de transfert de charge FAD : NADPH menant à la formation de flavosemiquinone ont été observées et décrites pour l'adrénodoxine réductase de bœuf (Kitagawa *et al.* 1982). En supposant que l'adrénodoxine réductase humaine et celle de bœuf se comportent de la même manière, on peut avancer les mêmes explications concernant hAdR que celles qui ont été proposées pour bAdR.

Le transfert d'hydrure du NADPH au FAD serait réversible et une partie de la protéine resterait donc sous forme oxydée malgré l'ajout d'un excès de NADPH, d'où la possibilité d'observer la formation du complexe de transfert de charge AdR-FAD : NADPH, espèce se formant transitoirement lors du transfert d'hydrure, cf. Schéma 26.

AdR-FAD + NADPH
$$\underset{k_{-1}}{\overset{k_{-1}}{\longleftarrow}}$$
 AdR-FAD : NADPH $\underset{k_{-2}}{\overset{k_{-2}}{\longleftarrow}}$ AdR-FADH₂ + NADP⁺

Schéma 26 : Mécanisme proposé pour le transfert d'hydrure (H⁻) du NADPH à AdR

Par ailleurs, hAdR possédant une très bonne affinité pour le NADPH, il pourrait se former un complexe entre la forme réduite de la protéine et le NADPH, AdR-FADH₂ : NADPH. Un tel complexe réagirait avec un complexe AdR-FAD : NADPH, présent en faibles quantité du fait de la réversibilité du transfert d'hydrure. Il y aurait alors comproportionation et formation de deux complexes FADH[•]_(AdR) : NADPH, cf. Schéma 27. C'est cette semiquinone formée que l'on voit apparaître lors de l'ajout d'un large excès de NADPH.

AdR-FADH₂ : NADPH + AdR-FAD : NADPH $\stackrel{k_3}{\longrightarrow}$ 2 AdR-FADH[•] : NADPH $\stackrel{k_3}{\longrightarrow}$ 2 AdR-FADH[•] : NADPH $\stackrel{k_3}{\longrightarrow}$ Semiquinone, 500 et 575 nm

Schéma 27 : Formation de la flavine semiquinone en présence d'un large excès de NADPH.

Lorsqu'on réalise la titration de hAdR avec du NADH, on constate que, de façon similaire à ce qui se passe avec le NADPH, il n'y pas réduction totale du FAD en FADH₂, cf. Figure 43 (85% du FAD de hAdR réduit avec 1,38 éq de NADH). En revanche, le maximum de réduction n'est pas atteint pour un équivalent de NADH et l'ajout d'un large excès de NADH ne fait pas apparaître de forme semiquinone du FAD : l'affinité du NADH pour l'adrénodoxine réductase est probablement plus faible que celle du NADPH, voir les études cinétiques présentées dans le chapitre VI.



Figure 43 : Titration de l'adrénodoxine réductase par le NADH. A. Spectres d'absorption UV-visible de l'adrénodoxine réductase avec différents équivalents de NADH. hAdR 9 μM, volume initial de 100 μL, ajout total de 25 μL de NADH à 50 μM puis 18 μL à 5 mM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 10 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus. **B. Pourcentage de FAD de l'adrénodoxine réductase réduit en fonction du nombre d'équivalents de NADH.** DO_f théorique calculée d'après la titration avec le dithionite.

II.4) Cristallogénèse de hAdR

Des petits cristaux de hAdR ont pu être obtenus dans les conditions suivantes (M. Lombard) : hAdR 10 mg/mL, sulfate d'ammonium 2 M, HEPES de sodium pH 7,5 100 mM et 2% de PEG 400 (v/v), cf. Figure 44.



Figure 44 : Cristaux de hAdR. hAdR 10 mg/mL, sulfate d'ammonium 2 M, HEPES de sodium pH 7,5 100 mM et 2% de PEG 400 (v/v).

Des travaux d'optimisation de ces cristaux sont en cours. Une structure de l'adrénodoxine réductase de bœuf avec ses cofacteurs FAD et NADP⁺, qui possède 89% d'identité de séquence avec l'adrénodoxine réductase humaine, a déjà été obtenue avec une résolution de 1,85 Å (Ziegler *et* Schulz 2000), cf. Figure 45.



Figure 45 : Structure cristallographique de l'adrénodoxine réductase de bœuf. Résolution 1,85 Å, code PDB 1E1L. En bleu, la protéine; en jaune, le FAD; en blanc, le NADP⁺.

III) Adrénodoxine de S. cerevisiæ, ScAdx

L'adrénodoxine *S. cerevisiæ*, désignée par ScAdx dans ce manuscrit, a été surexprimée grâce au plasmide pET15b-ScAdx, fourni par U. Mühlenhoff. La protéine ne possède pas sa séquence d'adressage à la mitochondrie (57 premiers acides aminés) et n'est pas pourvue de tag.

III.1) Surexpression et purification

L'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*, ScAdx, est bien exprimée dans *E. coli* avec un rendement de 25 mg par litre de culture, cf. partie III.2.d du chapitre II page 54 pour le protocole. Une colonne échangeuse d'anions suivie d'une colonne d'exclusion stérique Superdex 75 permet d'obtenir la protéine, 12,7 kDa, sous forme monomérique. ScAdx est rouge et possède un spectre d'absorption UV-visible caractéristique d'une protéine comportant un complexe [2Fe-2S] avec des bandes d'absorption à 341 nm, 414 nm et 457 nm, cf. Figure 46.



Figure 46 : Surexpression et purification de l'adrénodoxine de S. cerevisiæ. A. Gel d'électrophorèse Gel Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad) migré dans tampon MES. t_{ind}, cellules au temps d'induction, t_{réc}, cellules récoltées. B. Spectre d'absorption UV-visible de ScAdx. ScAdx 9 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

III.2) Dosage du fer et du soufre

Le dosage du fer contenu dans ScAdx selon la méthode décrite dans la partie III.3.a du chapitre II page 55 permet d'obtenir une valeur de 1,7 +/- 0,3 moles de fer par monomère de protéine.

Le dosage du soufre contenu dans ScAdx selon la méthode décrite dans la partie III.3.b du chapitre II page 55 permet d'obtenir une valeur de 2,3 +/- 0,3 moles de soufre par monomère de protéine.

Il est habituel de surestimer la proportion de soufre par rapport à celle de fer avec ces types de dosage : on peut donc considérer que chaque monomère de protéine contient deux fers et deux soufres et est donc complet et actif. En se basant sur le dosage de la protéine par la méthode de Bradford, on peut calculer un coefficient d'extinction molaire à 341 nm de 14,5 mM⁻¹.cm⁻¹, à 414 nm de 11 mM⁻¹.cm⁻¹ et à 457 nm de 9,3 mM⁻¹.cm⁻¹.

III.3) Titration par le dithionite

Afin de pouvoir caractériser spectralement les différents états oxydo-réducteurs de ScAdx, une titration de la protéine par le dithionite a été réalisée. Le nombre d'équivalents de dithionite ajouté par rapport à la protéine a été calculé en se basant sur le coefficient d'extinction molaire de la protéine déterminé à 414 nm, c'est-à-dire 11 mM⁻¹.cm⁻¹. Consécutivement à l'ajout de dithionite, les bandes d'absorption à 414 nm et 457 nm caractéristiques de la forme oxydée de la protéine, [2Fe-2S]²⁺, disparaissent et une bande d'absorption à 550 nm, caractéristique de la forme réduite de la protéine, [2Fe-2S]⁺, apparaît cf. Figure 47.



Figure 47 : Titration de l'adrénodoxine par le dithionite. A. Spectres d'absorption UV-visible de l'adrénodoxine avec différents équivalents de dithionite. FAD lié à ScAdx 21 μM, volume initial de 100 μL, ajout total de 18 μL de dithionite à 144 μM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 10 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus. **B. Pourcentage de FAD de l'adrénodoxine réductase réduit en fonction du nombre d'équivalents de NADPH.** DO_f est prise pour 1,09 équivalents de dithionite.

IV) Chaîne de transfert d'électrons

Afin de vérifier l'hypothèse d'une chaîne de transfert d'électrons du NADPH jusqu'à Coq6 via l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine, nous avons dans un premier temps testé la réduction en anaérobiose du FAD de Coq6 en présence de hAdR, ScAdx et de NADPH/NADH. Par la suite, nous avons essayé de décomposer les différentes étapes pour établir certaines constantes de vitesse. Dans cette partie, les concentrations données pour hAdR et Coq6 sont les concentrations en FAD lié à l'enzyme (ce qui fait des plus grandes concentrations en enzyme vu que l'on a moins d'un FAD par monomère de protéine).

IV.1) Réduction de Coq6 par le NADPH *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*

Une série d'expériences en anaérobiose a été réalisée en présence des trois enzymes purifiées (hAdR, ScAdx et Coq6) et de NADPH vu que ni le NADPH ni le NADH ne permettent la réduction de la flavine de la forme monomérique de Δ 1-24Coq6 ni de la forme tétramérique de MBP-Coq6. Ce travail s'effectuant en boîte à gants, un délai de 30 s s'écoule entre l'ajout d'une espèce et la réalisation du spectre d'absorption UV-visible ou le déclenchement du suivi cinétique à une longueur d'onde fixée.

IV.1.a) Réduction par le NADPH et le NADH

Dans un premier temps, nous avons ajouté 10 μ M de hAdR à un mélange de 10 μ M de forme monomérique de Δ 1-24Coq6 et de 500 μ M de NADPH, cf. Figure 48A. En théorie, en l'absence de réduction, l'ajout de 10 μ M de hAdR devrait conduire à une augmentation de 0,11 de la densité optique à 450 nm or on constate une augmentation de seulement 0,01. De plus, un signal caractéristique de la forme semiquinone de hAdR apparaît vers 575 nm. hAdR a donc vraisemblablement été réduite dans les 30 s écoulées entre son ajout au mélange protéique et la réalisation du spectre d'absorption UV-visible. On constate par ailleurs que le signal à 450 nm attribué à la flavine de Coq6 ne diminue pas.

A l'ajout de 10 μ M de ScAdx, on constate une rapide réduction de celle-ci : une bande d'absorption caractéristique de sa forme réduite [2Fe-2S]⁺ apparaît à 550 nm. On peut alors enregistrer une diminution du signal à 450 nm liée à réduction de la flavine de Coq6 : la présence de hAdR et ScAdx permet donc la réduction du FAD de Coq6 par le NADPH en une dizaine de minutes, cf. Figure 48B. Avec la présence de ScAdx, hAdR devrait se réoxyder mais comme sa réduction par le NADPH est rapide, elle est en permanence à l'état réduit et les variations constatées sont bien dues à la réduction de Coq6. La courbe rouge en pointillés est une courbe simulée correspondant à 10 μ M de Δ 1-24Coq6 oxydée, 10 μ M de hAdR réduite et 10 μ M de ScAdx réduite afin de visualiser quel pourrait être le spectre d'absorption initial, en se basant sur l'hypothèse que ScAdx est réduite de façon quasi immédiate.

Nous avons ainsi mis en évidence une chaîne de transfert d'électrons depuis le NADPH jusqu'à Coq6 *via* hAdR et ScAdx. On peut suivre la réduction de la flavine de Coq6 en enregistrant la diminution de l'absorbance à 450 nm : en émettant l'hypothèse que hAdR et ScAdx sont réduites très rapidement, on considère qu'à cette longueur d'onde le signal est représentatif de la réduction de la flavine de Coq6.



Figure 48 : Réduction de Δ1-24Coq6 de *S. cerevisiæ* par le NADPH *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ.* **A. Avant l'ajout de 1 éq de ScAdx.** Δ1-24Coq6 monomère 10 μM, hAdR 10 μM, NADPH 500 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. **B. Après l'ajout de 1 éq de ScAdx.** Courbe à 0 min simulée. Δ1-24Coq6 10 μM, hAdR 10 μM, ScAdR 10 μM, NADPH 500 μM tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

Le transfert d'électrons a également lieu lorsqu'on utilise du NADH à la place du NADPH. Cependant, la réduction de hAdR et ScAdx se fait beaucoup plus lentement et la diminution du signal à 450 nm n'est pas uniquement due à la réduction de la flavine de Coq6 : on enregistre la réduction de hAdR et ScAdx. Cette vitesse de réduction plus lente de hAdR et ScAdx est certainement liée à la moindre affinité de hAdR pour le NADH que pour le NADPH (cf. Chapitre VI).

Il nous est donc possible de proposer un schéma du transfert d'électrons ayant lieu lors de la réduction de Coq6 par le NADPH ou le NADH *via* ScAdR et ScAdx, cf. Schéma 28.



Schéma 28 : Transfert d'électrons depuis le NAD(P)H jusqu'à Coq6 via ScAdR et ScAdx

Par la suite, l'étude de la réduction de la flavine de Coq6 s'est fait uniquement en présence de NADPH afin de pouvoir étudier la vitesse de réduction du FAD de Coq6 en observant la diminution de l'absorbance à 450 nm. Il est en effet possible de simuler les courbes obtenues par une exponentielle décroissante et de comparer les différentes cinétiques enregistrées.

IV.1.b) Comparaison de Δ1-24Coq6 et MBP-Coq6

Dans un premier temps, nous avons voulu tester la forme tétramérique de MBP-Coq6 avec les mêmes proportions NADPH/hAdR/ScAdx/Coq6 (50 : 1 : 1 : 1) utilisées pour la forme monomérique de Δ 1-24Coq6, cf. Figure 49. On constate que le signal enregistré pour Δ 1-24Coq6 (0,04 UA) a une plus grande amplitude que celui enregistré pour MBP-Coq6 (0,06 UA). Cette différence d'amplitude s'explique par le fait que la différence de coefficient d'extinction molaire entre la forme oxydée et la forme réduite de la protéine n'est pas la même pour les deux formes protéiques. Concernant la forme tétramérique de MBP-Coq6, on a $\varepsilon_{ox} - \varepsilon_{réd} \approx 7 \text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (cf. Figure 53 page 133) tandis que pour la forme monomérique de Δ 1-24Coq6, on a $\varepsilon_{ox} - \varepsilon_{réd} \approx$ 9 mM⁻¹cm⁻¹ (tiré de la titration représentée Figure 29 page 102) : ceci est dû en partie à la présence plus importante du contaminant héminique dans la forme tétramérique de MBP-Coq6. Pour une concentration donnée, on va donc avoir une amplitude du signal plus importante avec Δ 1-24Coq6 qu'avec MBP-Coq6. Dans les deux cas, on obtient des constantes de vitesse similaires pour les deux formes, de l'ordre de 0,35 min⁻¹ (ou 0,006 s⁻¹).



Figure 49 : Réduction de Coq6 de *S. cerevisi*æ par le NADPH via l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisi*æ. NADPH 500 μM, hAdR 10 μM, ScAdx 10 μM, Coq6 10 μM, Tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

IV.1.c) Influence des concentrations en hAdR et ScAdx sur la réduction de Δ 1-24Coq6 par le NADPH

Nous avons par la suite testé l'influence des concentrations en hAdR et ScAdx sur la réduction de Δ 1-24Coq6 par le NADPH, cf. Figure 50. Les constantes de vitesses changent relativement peu en fonction des concentrations utilisées. Il semblerait donc que les concentrations choisies en hAdR et ScAdx soient saturantes et que l'étape limitante soit la réduction de Coq6.



Figure 50 : Comparaison de différentes conditions de réduction de Δ 1-24Coq6. Δ 1-24Coq6 10 μ M, NADPH 500 μ M, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

IV.1.d) Influence de la présence d'analogues de substrat

Une fois les analogues de substrats synthétisés, cf. chapitre V, nous avons également voulu savoir si leur présence influait sur la vitesse de réduction de la flavine de Coq6. Cependant, l'ajout de 500 μ M de NADPH dans un mélange de 10 μ M de Δ 1-24Coq6, 10 μ M de hAdR et 10 μ M de ScAdx incubé 10 min en présence de 200 μ M de FHQ (farnésylhydroquinone) ou de FHB (acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque) ne permet pas une réduction du FAD de Δ 1-24Coq6 plus rapide que lorsqu'il n'y a pas d'analogue de substrat dans le mélange enzymatique.

Nous avons donc mis en évidence *in vitro* que Coq6 de *S. cerevisiæ* est réduite par une chaîne de transfert d'électrons allant du NADPH au FAD de Coq6 *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*. Afin d'essayer de déterminer quelle pouvait être l'étape cinétiquement limitante du processus, nous avons alors voulu en étudier les différentes étapes.

IV.2) Transfert d'électrons entre l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*

Nous avons tout d'abord mesuré la constante cinétique du transfert d'électrons entre l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*. Pour ce faire, nous avons étudié dans des expériences de *steady state* la réduction du cytochrome *c* par le NADPH *via* hAdR et ScAdx.

Il a été montré avec l'adrénodoxine réductase, bAdr, et l'adrénodoxine de bœuf, bAdx, (Chu *et* Kimura 1973a) que la réduction du cytochrome *c* par le NADPH n'est possible que lorsque les deux protéines sont présentes. L'adrénodoxine réductase seule n'est pas capable de réduire le cytochrome *c* car ces deux protéines sont essentiellement chargées positivement en surface et interagissent très mal. Le suivi de la réduction du cytochrome *c* est donc un bon moyen de suivre le transfert d'électrons entre adrénodoxine réductase et adrénodoxine. Par ailleurs, bAdx et bAdR forment un complexe 1 : 1 avec une constante de dissociation très faible de l'ordre du nanomolaire (Chu et Kimura 1973b). Ce complexe est l'espèce active pour la réduction du cytochrome *c* un pour un est atteint et est de l'ordre de 6 s⁻¹.

Lors de nos expériences, nous avons tout d'abord constaté l'absence de réduction directe du cytochrome *c* par l'adrénodoxine réductase humaine en présence de NADPH. L'ajout de l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* a permis d'observer la réduction du cytochrome *c*, ce qui confirme que le transfert d'électrons entre l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* est bien possible même si les deux protéines viennent d'organismes différents. Dans les conditions utilisées, les concentrations en NADPH et cytochrome *c* étaient saturantes.

Contrairement à ce qui se passe pour bAdR et bAdx, on constate que la vitesse maximale de réduction n'est pas atteinte pour un ratio 1 : 1. Plus on augmente la concentration d'adrénodoxine réductase humaine, plus la vitesse de réduction du cytochrome *c* augmente, cf. Figure 51. Ceci signifie que l'affinité de l'adrénodoxine réductase humaine pour l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* est très faible. Nous avons ainsi constaté une augmentation de la vitesse de réduction du cytochrome *c* jusqu'à 17,5 μ M en hAdR. Nous ne sommes pas allés au-delà de cette concentration car nous ne disposions pas d'une quantité d'enzyme suffisante.

La réduction du cytochrome c se fait grâce à une chaîne de transfert d'électrons depuis le NADPH via hAdR et ScAdx, on a :

hAdR_{ox} + NADPH \rightleftharpoons hAdR_{réd} + NADP⁺ (1) hAdR_{réd} + ScAdx_{ox} \rightleftharpoons hAdR_{ox} + ScAdx_{réd} (2) ScAdx_{réd} + Cytc_{ox} \rightleftharpoons ScAdx_{ox} + Cytc_{réd} (3)

On peut supposer que l'étape cinétiquement limitante est celle du transfert d'électrons entre hAdR et ScAdx vu que la vitesse de réduction du cytochrome *c* augmente quand la concentration en hAdR augmente, avec des concentrations en NADPH, ScAdx et cytochrome *c* fixées. En réalisant une simulation, on peut alors déterminer un K_M de hAdR pour ScAdx de 28 +/-4 μ M et un k_{cat} de 89 +/- 8 s⁻¹. Ce k_{cat} représenterait la vitesse de transfert d'électrons entre hAdR et ScAdx. Il est plus élevé que celui obtenu pour bAdR et bAdx (6 s⁻¹). Il serait intéressant de s'affranchir du cytochrome *c* en travaillant à forte concentration de ScAdx : il serait possible de suivre directement par spectroscopie d'absorption UV-visible sa cinétique de réduction en présence de NADPH et de hAdR.



Figure 51 : Détermination du K_M **de l'adrénodoxine réductase humaine pour l'adrénodoxine de** *S. cerevisiæ.* Tampon K phosphate pH 7,5 100 mM, Cytochrome *c* 20 μM, NADPH 100 μM, ScAdx 10 nM, 27°C, volume total 500 μL.

Sachant que l'adrénodoxine réductase humaine possède 30% d'identité de séquence avec l'adrénodoxine réductase de *S. cerevisiæ*, et que l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* possède 30% d'identité de séquence avec son homologue humaine, cf. Figure 52A, il est probable que les domaines d'interaction soient trop différents pour qu'il y ait une bonne reconnaissance, d'où la mauvaise affinité. La structure du complexe formé entre adrénodoxine et adrénodoxine réductase de bœuf est présenté Figure 52B.


Figure 52 : A. Superposition de la structure cristallographique de Fdx2 résolue à 1,7 Å en vert (homologue fonctionnel de ScAdx, code PDB 2Y5C) et de la structure de ScAdx obtenue par RMN en rouge (code PDB 2MJE). Le centre [2Fe-2S] des deux protéines est représenté en jaune (soufre) et bleu (fer). (tirée de Webert *et al.* 2014). B. Structure cristallographique résolue à 2,3 Å du complexe bAdR (bleue)-bAdx (rouge) de bœuf (Müller *et al.* 2001, code PDB 1E6E). Le FAD de bAdR est en jaune et le centre [2Fe-2S] de bAdx en jaune (soufre) et orange (fer). Le cercle orange entoure une hélice alpha homologue entre les trois protéines : une rotation de bAdx de 180° par rapport à l'axe y permet de retrouver une orientation de la protéine similaire à celle présentée pour Fdx2 et ScAdx.

La valeur de $K_{\rm M}$ de l'adrénodoxine réductase humaine pour l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*, env. 30 μ M, est donc assez élevée mais le transfert d'électrons entre hAdR et ScAdx est rapide, de l'ordre de 90 s⁻¹ si on considère que le $k_{\rm cat}$ obtenu est le reflet de cette étape. Comme le laissaient supposer la réduction rapide de hAdR et ScAdx lors du test complet comprenant Coq6 ainsi que les faibles variations de la vitesse de réduction de Coq6 en fonction des concentrations en hAdR et ScAdx, le transfert d'électrons entre hAdR et ScAdx n'est donc pas l'étape limitante dans la chaîne de transfert d'électrons à Coq6.

IV.3) Transfert d'électron entre l'adrénodoxine réduite et Coq6 de S. cerevisiæ

Comme ce n'est pas l'étape de transfert entre hAdR et ScAdx qui limite la vitesse de réduction de la flavine de Coq6 en présence de NADPH, hAdR et ScAdx, nous avons voulu déterminer la vitesse de transfert d'électrons entre ScAdx et Coq6, les deux enzymes provenant du même organisme.

Pour ce faire, nous avons d'abord vérifié avec la forme tétramérique de MBP-Coq6 que le transfert d'électrons entre ScAdx réduite et Coq6 était possible en l'absence de hAdR et de NADPH en réalisant une titration de Coq6 par ScAdx sous forme réduite [2Fe-2S]⁺.

Si on considère la chaîne de transfert d'électrons en termes de potentiel rédox, il est tout à fait possible qu'une adrénodoxine puisse transférer des électrons entre deux flavoprotéines car les flavines contenues dans celles-ci peuvent avoir des potentiels de demi-réduction très variables selon leur environnement chimique. Les centres [2Fe-2S] des adrénodoxines ont un potentiel rédox aux alentours de -300 mV (Ewen *et al.* 2010). Les monooxygénases à flavine, quant à elles, ont des potentiels rédox plus positifs : à pH 7,5, la phénol hydroxylase possède un potentiel de demi-réduction de -222 mV (Xu *et al.* 2001), la pHBH de -163 mV (Entsch *et al.* 1991) et la salycilate hydroxylase de -70 mV (Einarsdottir *et al.* 1988). Thermodynamiquement, le transfert entre adrénodoxine et monooxygénase à flavine semble donc possible.

ScAdx et Coq6 absorbant aux mêmes longueurs d'onde, les spectres obtenus peuvent être difficiles à interpréter, c'est pourquoi il nous a paru intéressant de pouvoir les simuler. Les coefficients d'extinction molaire des différentes formes oxydées et réduites des protéines ont donc été déterminés grâce aux spectres d'absorption UV-visibles réalisés lors des titrations par le dithionite, cf. Figure 53.



Figure 53 : Coefficients d'extinction molaire de MBP-Coq6 oxydée, ScAdx oxydée, MBP-Coq6 réduite, ScAdx réduite en fonction de la longueur d'onde.

En théorie, quand on met en présence ScAdx réduite et Coq6 on devrait avoir la réaction suivante :

$$2 [2Fe - 2S]_{ScAdx}^{+} + FAD_{coq6} + 2H^{+} = 2 [2Fe - 2S]_{ScAdx}^{2+} + FADH_{2}$$

En quantité sous-stœchiométrique de ScAdx réduite, en-dessous de deux équivalents par rapport à Coq6, la densité optique obtenue devrait être (c_{Coq6} correspond à la concentration totale en Coq6 et c_{ScAdx} à la concentration totale en ScAdx) :

$$D0 = c_{Coq6}\varepsilon_{Coq6_{ox}} + c_{ScAdx}(\frac{1}{2}\varepsilon_{Coq6_{réd}} - \frac{1}{2}\varepsilon_{Coq6_{ox}} + \varepsilon_{ScAdx_{ox}})$$

En excès de ScAdx, au-delà de deux équivalents par rapport à Coq6, la densité optique obtenue devrait être :

$DO = c_{ScAdx} \varepsilon_{ScAdx_{réd}} + c_{Coq6} (2 \varepsilon_{ScAdx_{ox}} - 2 \varepsilon_{ScAdx_{réd}} + \varepsilon_{Coq6_{réd}})$

L'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*, ScAdx, a été préalablement réduite de façon stœchiométrique par du dithionite. L'éventuel excès de dithionite et les produits de l'oxydation de celui-ci ont été éliminés sur une colonne NAP-10 (GE Healthcare). Il s'agit d'une colonne d'exclusion stérique qui permet d'éliminer les petites molécules présentes dans un échantillon.

Une fois réduite, ScAdx est ajoutée à MBP-Coq6 et on enregistre les spectres d'absorption UV-visibles obtenus après mélange, cf. Figure 54. L'absorbance à 414 et 457 nm augmente, ce qui signifie que ScAdx est bien réoxydée, et l'épaulement à 470 nm provenant de la forme oxydée de MBP-Coq6 disparaît, ce qui signifie que MBP-Coq6 est bien réduite. De plus, les spectres simulés correspondent aux spectres obtenus.



Figure 54 : Réduction de la forme tétramérique de MBP-Coq6 par ScAdx sous forme réduite. MBP-Coq6 12,1 μM, volume initial de 100 μL, ajout total de 27 μL de ScAdx réduite à 95 μM, tampon Tris pH 7,5 100 mM, trajet optique de 10 mm, le facteur de dilution a été corrigé sur les spectres obtenus.

ScAdx sous forme réduite est donc capable de réduire Coq6 et il va donc être possible de déterminer une vitesse de transfert d'électrons entre ces deux protéines. Nous pourrons également comparer la forme tétramérique de MBP-Coq6 et la forme monomérique de Δ 1-24Coq6 Nous avons donc réalisé des expériences en utilisant la forme monomérique de Δ 1-24Coq6 et la forme tétramérique de MBP-Coq6 et la sous de ScAdx réduite (5 éq). Nous avons alors observé l'augmentation de l'absorbance à 508 nm, cf. Figure 55 : elle est liée

exclusivement à la réoxydation de ScAdx car il s'agit d'un point isobestique pour les formes oxydée et réduite de Coq6. On peut donc déterminer une constante de vitesse de la réoxydation de ScAdx en modélisant la courbe par : $\Delta DO_{508 nm}(t) = C(1 - e^{-kt})$.



Figure 55 : Réduction de Coq6 par ScAdx réduite. Coq6 10 μM, ScAdx réduite 50 μM, volume total 100 μL, tampon Tris-HCl pH 7,5 100mM

Ainsi, pour la forme monomérique de $\Delta 1$ -24Coq6, on trouve $k = 1,56 +/- 0,02 \text{ min}^{-1}$ (0,026 s⁻¹) et pour la forme tétramérique de MBP-Coq6 $k = 0,71 +/- 0,001 \text{ min}^{-1}$ (0,012 s⁻¹). La réduction est donc à peu près deux fois plus rapide avec la forme sans la MBP qu'avec la forme la possédant : il est possible que la présence de la MBP puisse en partie gêner la reconnaissance entre les deux protéines et par conséquent le transfert d'électrons. Par ailleurs, les deux protéines n'ont pas le même état d'oligomérisation, ce qui peut également expliquer cette différence. Dans les deux cas, on a des constantes de vitesse légèrement supérieures à celles trouvées lors des essais complets NADPH/hAdR/ScAdx/Coq6 (0,006 s⁻¹) mais bien inférieures à celle déterminée pour le transfert d'électrons entre hAdrR et ScAdx (20 s⁻¹): il semblerait donc que l'étape limitante de la chaîne de transfert d'électrons soit le passage de ScAdx à Coq6.

Cette expérience a été réalisée avec une seule concentration de ScAdx : il serait intéressant de la reproduire avec différentes concentrations afin de déterminer le K_d de ScAdx_{réd} pour Coq6.

V) Conclusion

Nous avons donc mis en évidence *in vitro* que Coq6 de *S. cerevisiæ* peut être réduite par une chaîne de transfert d'électrons allant du NADPH au FAD *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*. Les potentiels rédox des trois protéines mises en jeu n'ayant pas encore été déterminés à notre connaissance, il pourrait être intéressant à l'avenir de caractériser électrochimiquement l'ensemble de la chaîne de transfert proposée.

Nous avons donc réussi à observer un transfert d'électrons rapide entre hAdR et ScAdx, de l'ordre de 90 s⁻¹ (5400 min⁻¹), malgré un K_d faible d'environ 30 µM. En revanche, le transfert d'électrons entre ScAdx réduite et Coq6 est trois ordres de grandeur plus lent, de l'ordre de 0,026 s⁻¹ (1,56 min⁻¹). Nous constatons également que le transfert d'électrons de l'adrénodoxine à Δ 1-24Coq6 est environ deux fois plus rapide que celui à MBP-Coq6. La présence du tag MBP (42,5 kDa) doit certainement gêner l'interaction entre l'adrénodoxine et Coq6 et diminuer l'efficacité du transfert d'électrons entre le centre [2Fe-2S] et le FAD. Il serait intéressant de déterminer le K_d de Coq6 pour ScAdx pour mieux connaître le phénomène.

Lorsque nous mettons en place le système de transfert d'électrons dans sa totalité (NADPH, hAdR, ScAdx, Coq6), il semblerait que la vitesse de réduction de la flavine de Coq6 (0,006 s⁻¹ ou 0,36 min⁻¹) soit limitée par le transfert d'électrons de ScAdx à Coq6. Plusieurs hypothèses sont à envisager pour expliquer cette vitesse relativement lente. Il peut y avoir une compétition entre la formation d'un complexe hAdR : ScAdx et d'un complexe ScAdx : Coq6 ou alors on peut envisager la nécessité d'un complexe ternaire AdR : Adx : Coq6 qui dans notre cas ne serait pas efficace car les protéines proviennent d'organismes différents. Il serait intéressant d'étudier cette chaîne de transfert d'électrons dans un système homologue avec ScAdR et ScAdx. Enfin, il est possible que la présence du substrat et/ou d'une bicouche lipidique voire de la totalité du complexe protéique de biosynthèse de l'ubiquinone soient nécessaires pour que les protéines adoptent les conformations les plus efficaces et que la vitesse de réduction de la flavine de Coq6 soit optimale.

CHAPITRE V :

Etude enzymatique de Coq6 avec des analogues de substrat synthétisés

I) Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le substrat de Coq6 reste hypothétique. Il est composé d'un noyau aromatique et d'une chaîne polyisoprényle mais les substituants présents sur le noyau aromatique, en particulier le groupement chimique en C-1, ne sont pas connus avec certitude, cf. partie III.I.b du chapitre I page 33.

Dans le cadre de l'étude de l'activité enzymatique de Coq6 de *S. cerevisiæ*, nous avons donc décidé d'utiliser différents noyaux aromatiques comme substrats potentiels. Nous avons choisi de synthétiser des analogues de substrat comportant trois unités isoprényles. En effet, plusieurs constatations nous ont menés à penser que la catalyse serait plus efficace si les analogues de substrats comportaient le plus grand nombre d'unités isoprényles. Tout d'abord, l'efficacité catalytique de l'homologue humaine de Coq7 (hydroxylase en C-6) est six fois plus grande quand l'analogue utilisé comporte deux unités isoprényles que quand il n'en comporte pas (Lu *et al.* 2013).

En outre, l'arimage d'analogues de substrat avec différentes longueurs de chaîne isoprényle dans le modèle bioinformatique de Coq6 a permis de constater qu'entre zéro et deux unités isoprényles attachées au noyau aromatique, le substrat n'adoptait pas de conformation stable dans la poche située à proximité du noyau isoalloxazine du FAD et qu'il n'était pas bien positionné dans le canal d'accès au FAD. En revanche, avec trois unités isoprényles ou plus, le noyau aromatique du substrat adoptait une conformation stable dans le site actif et sa chaîne hydrophobe était correctement positionnée dans le canal d'accès au FAD.

Le choix de trois unités semblait donc un bon compromis entre la facilité de synthèse des analogues (les réactifs comportant plus de trois unités isoprényles ne sont pas disponibles commercialement) et la potentielle activité de Coq6 sur les analogues choisis. Par ailleurs, nous avons également synthétisé deux molécules correspondant aux produits supposés de l'action de Coq6 sur deux des analogues de substrat, cf. Schéma 29 ci-après.



Schéma 29 : Analogues de substrats testés et produits supposés de l'action de Coq6. Par parenthèse, composé non synthétisé durant la thèse.

II) Synthèse d'analogues de substrat

Ce travail de synthèse organique a été réalisé avec l'aide du Dr. Y. Xu-Li. Cinq molécules ont été synthétisées : trois analogues de substrats potentiels et deux des analogues de produits associés, cf. Schéma 30. L'ensemble des synthèses est basé sur le travail de Lang et Steglish (2005).



Schéma 30 : Analogues de substrats et produits synthétisés.

Les conditions expérimentales ainsi que les caractérisations des produits obtenus (RMN, spectres d'absortion UV-visible) sont détaillées dans le chapitre II : page 60 pour l'acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (FHB, **6**) qui est associé à l'acide 3-farnésyl-4,5-dihydroxybenzoïque page 63 (FHB-OH, **13**), page 67 pour la farnésylhydroquinone (FHQ, **17**), et enfin page 70 pour le farnésylphénol (FPol, **21**) qui est associé au farnésylcatéchol page 73 (FCat, **25**). Pour des raisons de temps et de complexité d'obtention du noyau aromatique, le produit associé au farnésylhydroquinone n'a pu être synthétisé.

La stratégie est la même pour toutes les molécules : obtention et protection du noyau aromatique désiré avec un halogène sur la position où va être réalisé le couplage de la chaîne farnésyle (trois unités ispoprényles), réalisation du couplage puis déprotection du noyau aromatique et purification finale.

II.1) Protection du noyau aromatique

La réaction de couplage du noyau aromatique et de la chaîne farnésyle se faisant soit *via* un réactif de Grignard soit *via* un carbanion issu d'un échange halogène – métal, ces espèces très réactives ne doivent pouvoir réagir qu'avec la molécule souhaitée : il ne faut pas qu'elles soient détruites par des hydrogènes réactifs présents sur les molécules engagées. Les fonctions hydroxyle

(-OH) et carboxy (-COOH) sont donc protégées en les transformant en fonctions méthoxyméthoxy (-OCH₂OCH₃) d'une part et en ester d'autre part (-COOCH₃).

Les molécules de départ utilisées, à l'exception du FHB-OH, ont juste besoin de voir leurs fonctions hydroxyles protégées avant d'être couplées au farnésyle. Cette protection se fait par l'action du chlorure de méthoxyméthyle sur les hydroxyles en présence d'une base, la DIEA (Di-Isopropyl-EthylAmine), cf. Schéma 31.



Schéma 31 : Protection d'une fonction hydroxyle par le chlorure de méthoxyméthyle.

Concernant le FHB-OH, l'obtention du noyau aromatique avant couplage s'avère plus complexe, cf. Schéma 32. Le 3-iodo-4,5-dihydroxybenzoate de méthyle (**10** sans protections méthoxyméthyle) n'étant pas disponible commercialement, il nous faut partir de l'iodovanilline **7** (Lang *et* Steglish 2005). Dans un premier temps, l'iodovanilline est déméthylée par l'action du BBr₃, la réaction est quenchée par le méthanol. Les deux fonctions hydroxyles sont alors protégées et on peut oxyder la fonction aldéhyde en fonction ester grâce à l'action d'un mélange de diiode et d'hydroxyde de potassium dans du méthanol.





II.2) Couplage de la chaîne isoprényle

Nous avons commencé par synthétiser le FHB et le FHB-OH en utilisant transitoirement un réactif de Grignard pour réaliser le couplage de la chaîne isoprényle. L'halogène présent sur le noyau aromatique de départ permettant d'accèder à ces molécules est l'iode. Dans un premier temps, un réactif de Grignard est obtenu *via* un échange halogène – magnésium dans les conditions de Knochel (Ar-I + iPr-MgBr = Ar-MgBr + iPr-I). Par la suite, l'ajout de Li₂CuCl₄ en quantité catalytique permet la formation d'un organocuprate (2 ArMgBr + CuCl = (Ar₂Cu)MgBr + ClMgBr) qui va réagir avec le bromofarnésyle : on obtient alors la molécule désirée ((Ar₂Cu)MgBr + Far-Br = Ar-Far + (ArCuBr)MgBr).

Cependant, les rendements pour le couplage se sont révélés relativement faibles comparés à ceux obtenus dans la publication utilisée comme base de travail (Lang *et* Steglish 2005) : alentours de 15-25% contre 80% de. En outre, lorsque nous avons voulu appliquer cette méthode à la synthèse des FHQ, FPol et FCat, nous n'avons pas réussi à réaliser le couplage et avons récupéré uniquement le noyau aromatique réduit, l'atome d'iode étant remplacé par un atome d'hydrogène.

Nous avons donc décidé de changer de méthode de couplage en utilisant cette fois-ci un intermédiaire lithié provenant d'un échange halogène – lithium entre un noyau aromatique bromé et le tertiobutyl de lithium (Ar-Br + tBu-Li = Ar-Li + tBu-Br) (Bogenstätter *et al.* 1999). Par la suite, de façon similaire à ce qu'il se passe avec le magnésien, l'ajout de Li₂CuCl₄ en quantité catalytique permet la formation d'un organocuprate (2 Ar-Li + CuCl = (Ar₂Cu)Li + LiCl) qui réagit avec le bromofarnésyle : on obtient alors la molécule désirée ((Ar₂Cu)Li + Far-Br = Ar-Far + (ArCuBr)Li). Cependant, nous avons à nouveau récupéré le produit réduit en utilisant cette méthode.

Le lot de bromofarnésyle utilisé dans cette deuxième série d'expérience étant différent, il se pouvait que le problème vienne de sa pureté. Nous avons donc réalisé un spectre RMN-¹H du produit commercial qui a révélé la présence d'un pic inattendu à 7,38 ppm, potentiellement dû à la présence de traces d'acide bromhydrique nécessaire à sa synthèse, cf. Figure 56. Ces traces d'acide vont pouvoir réagir avec l'intermédiaire organocuprate lors de l'ajout du bromofarnésyle et le réduire car cette réaction est plus rapide que celle de couplage. Afin de nous affranchir de ces traces d'acides, nous avons réalisé un lavage basique du bromofarnésyle avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium qui nous a permis de récupérer un produit pur dont le spectre RMN-¹H ne présentait plus de pic à 7,38 ppm.

L'utilisation de ce produit purifié permet de réaliser les réactions de couplage menant aux FHQ, FPol et FCat en utilisant l'intermédiaire lithié avec un rendement d'environ 20%. Ce rendement reste relativement bas mais permet d'obtenir les molécules désirées en quantités suffisantes.



Figure 56 : Spectre RMN-¹H du bromofarnésyle commercial.

II.3) Déprotection et purification en HPLC

Une fois le couplage terminé, il suffit de déprotéger le noyau aromatique afin d'obtenir la molécule désirée.

Pour le FHB et le FHB-OH, la première étape est de récupérer la fonction carboxyle par une étape de saponification de l'ester en milieu basique.

Après cela, comme pour les autres molécules, les fonctions hydroxyles sont récupérées par action d'un acide sur les méthoxyméthoxyles. Différentes méthodes ont été testées. Dans un premier temps, l'APTS (Acide *Para*-Toluène Sulfonique) a été utilisé en chauffant le milieu réactionnel à 60°C pour FHB et FHB-OH (Lang *et* Steglish 2005). Les rendements obtenus n'étant pas optimaux, une méthode avec du chlorure d'acétyle décrite ultérieurement (Lang *et al.* 2008) a été utilisée pour FHQ, FPol et FCat. Cependant, les rendements obtenus n'ont pas été améliorés. De plus, dans le cas du FCat, la molécule protégée de départ a été totalement dégradée et il n'a pas été possible de récupérer le FCat déprotégé. Finalement, l'utilisation d'APTS sans chauffage, condition plus douce, s'est révélée plus efficace avec un rendement de 82% pour le FCat

Les substrats supposés (FHB, FHQ et FPol) ont été purifiés par HPLC sur une colonne préparative afin d'obtenir le composé le plus pur possible pour les tests enzymatiques et de s'affranchir de toute impureté qui pourrait inhiber la réaction. Les produits associés aux substrats (FHB-OH et FCat) servant d'étalon, ils étaient suffisamment purs après leur purification par chromatographie éclair.

Du fait de la présence de la chaîne grasse farnésyle, les différents composés ne sont pas solubles dans l'eau. Des solutions à 50 mM dans du DMSO sont donc préparées : les composés y sont solubles sans difficulté et il s'agit d'un solvant approprié car peu sujet à l'évaporation et toléré par les protéines à hauteur de quelques pourcents. Lorsqu'on dissout cette solution mère dans du tampon, on constate par spectroscopie d'absorption UV-visible qu'à une concentration de 500 µM les solutions contenant le FHQ le FPol ou le FCat, contrairement à celles contenant le FHB ou le FHB-OH, diffusent la lumière. Le FHQ, le FPol et le FCat semblent donc moins solubles que le FHB et le FHB-OH, probablement en raison de l'absence de la fonction carboxylate.

III) Tests enzymatiques de Coq6 de S. cerevisiæ

III.1) Mise au point de méthodes de détection des analogues de substrats et de produits de Coq6 par HPLC

Les tests enzymatiques ont été réalisés avec trois formes protéiques de Coq6 de *S. cerevisiæ* : la forme oligomérique de MBP-Coq6, la forme tétamérique de MBP-Coq6 et la forme monomérique de Δ 1-24Coq6.

L'analyse par HPLC des échantillons issus des différents essais s'est faite avec une colonne analytique Hypersil GOLD[™] C18 2,1 x 50 mm ou une colonne C-18 Atlantis Prep T3 10 x 250 mm. Nous avons mis au point des élutions isocratiques du couple analogue de substrat/produit supposé, quand ce dernier était disponible, afin de les séparer façon optimale.

Pour le FHB et le FHB-OH, nous avons obtenu un écart de 2 min entre les deux pics. Cet écart permet de distinguer les deux composés pour une concentration de 249 μ M en FHB et 1 μ M en FHB-OH, cf. Figure 57. La courbe de calibration permettant l'évaluation de la concentration du produit obtenu dans les échantillons n'a pas été réalisée au maximum des pics repérés par spectroscopie d'absorption UV-visible (255 et 290 nm pour FHB-OH, cf. page 66) mais à 205 nm où la molécule absorbe plus : la sensibilité du détecteur UV-visible de l'HPLC permet alors de détecter jusqu'à 0,5 μ M de FHB-OH.



Figure 57 : A. Profil d'élution d'un mélange FHB/FHB-OH. B. Courbe de calibration à 205 nm pour le FHB-OH. Echantillon dans un mélange tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM/EtOH/ACN (50:25:25). Elution isocratique avec 60% d'ACN/MeOH/H₂O (70:20:10) et 40% H₂O acétate d'ammonium pH 4 10 mM à 0,5 mL/min. Colonne Hypersil GOLD™ C18 2,1 x 50 mm.

Concernant le FPol et le FCat, nous avons un écart de 9 min, cf. Figure 58, entre les deux pics : ceux-ci ne se recouvrent pas. La courbe de calibration permettant l'évaluation de la concentration du produit obtenu dans les échantillons n'a pas été réalisée au maximum du pic repéré par spectroscopie d'absorption UV-visible (276 nm pour FCat, cf. page 75) mais à 205 nm où la molécule absorbe plus : la sensibilité du détecteur UV-visible de l'HPLC permet alors de détecter jusqu'à 0,5 µM de FCat.



Figure 58 : A. Profil d'élution d'un mélange FPol (100 μM)/FCat (100 μM). B. Courbe de calibration à 205 nm pour le FCat. Echantillon dans un mélange tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM/EtOH/ACN (50:25:25). Elution isocratique avec 55% d'ACN et 45% H₂O acétate d'ammonium pH 4 10 mM à 0,5 mL/min. Colonne Hypersil GOLD[™] C18 2,1 x 50 mm.

Le produit éventuel associé au FHQ n'ayant pas été synthétisé, l'élution isocratique du FHQ a été mise au point pour que celui-ci soit élué le plus tard possible, cf. Figure 59. Si on s'appuie sur la séparation entre le FPol et le FCat, on peut supposer que le pic éventuel sera distinct du pic d'injection et du pic du substrat. La sensibilité du détecteur UV-visible permet de détecter jusqu'à 0,5 µM de FHQ à 205 nm.



Figure 59 : Profil d'élution du FHQ (100 μM). Echantillon dans un mélange tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM/EtOH/ACN (50:25:25). Elution isocratique avec 45% d'ACN et 55% H₂O acétate d'ammonium pH 4 10 mM à 0,5 mL/min. Colonne Hypersil GOLD™ C18 2,1 x 50 mm.

L'ensemble des conditions utilisées est résumé dans le Tableau 12 ci-dessous :

	FHB	FHQ	FPol			
Colonne	Hypersil GOLD™ C18 2,1 x 50 mm					
Eluant A	H ₂ O 10 mM acétate d'ammonium pH 4					
Eluant B	ACN/MeOH/H ₂ O, 70:20:10	ACN				
Conditions d'élution	60% B 20 min	45% B 25 min	55% B 25 min			
Temps d'élution du substrat	12,5 min	20 min	20 min			
Temps d'élution du produit	FHB-OH		FCat			
supposé	10,5 min	-	11 min			

Tableau 12 : Conditions d'analyse par HPLC des essais enzymatiques en fonction du substrat utilisé.

Il a été choisi de travailler à une concentration finale en FAD lié à Coq6 de 20 μ M. Cette concentration est assez élevée : la sensibilité du détecteur UV-visible pour les produits supposés de l'action de Coq6 sur les analogues de substrat étant de 0,5 à 1 μ M, on pourra ainsi détecter des *turnovers* très faibles.

A noter que le temps de rétention des différentes molécules peut varier avec la température d'une à deux minutes mais que l'écart entre les différents pics reste sensiblement le même. Une analyse spectrale des pics permet de confirmer la nature des molécules détectées.

III.2) Réduction par le NADPH *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*

Dans un premier temps, nous avons réalisé une expérience avec la chaîne de transfert d'électrons NADPH/hAdR/ScAdx/Coq6. Le substrat (500 μM) a été incubé pendant 5 min en anaérobiose avec Coq6 de *S. cerevisiæ* (20 μM) ainsi qu'un équivalent d'adrénodoxine réductase (20 μM) humaine et un équivalent d'adrénodoxine de *S. cerevisiæ* (20 μM). Par la suite, le NADPH

(1 mM) est ajouté. Ces étapes se font en anaérobiose pour être sûr que Coq6 ait bien été réduite et soit donc capable de former le peroxyde de flavine avec l'oxygène de l'air par la suite. Il est en effet possible qu'on ait une « fuite » d'électrons *via* hAdR et ScAdx qui produirait des espèces réactives de l'oxygène au lieu de réduire Coq6.

Après cela, les échantillons sont ouverts à l'air 15 min sans agitation puis agités 15 min. A ce moment-là, le NADPH a été entièrement consommé et les protéines sont sous forme oxydée (contrôle par spectroscopie d'absorption UV-visible). On ajoute alors à nouveau du NADPH, cette fois-ci en présence d'oxygène, pour avoir une concentration de 500 µM et les échantillons sont agités 15 min à nouveau. Cette étape pourrait s'avérer utile si Coq6 a besoin d'être à l'état oxydé (et non réduit comme précédemment) pour pouvoir lier le substrat puis réaliser l'hydroxylation.

La réaction est alors stoppée par ajout d'un volume équivalent d'un mélange éthanol/acétonitrile (50:50) qui va faire précipiter la protéine et permettre de récupérer les molécules organiques après centrifugation.

A l'issue de ces neuf essais sur les trois formes de Coq6 avec les trois analogues synthétisés, il s'avère qu'on ne peut détecter l'apparition d'un produit en HPLC, exemple Figure 60 avec la forme monomérique de Δ 1-24Coq6. Dans tous les cas, les pics correspondants aux différents substrats sont toujours présents et on ne détecte pas de nouveaux pics. Le pic vers 2,5 min sur le chromatogramme du FHB correspond à une impureté présente avec le FHB, cf. Figure 57. Le pic vers 7 min sur le chromatogramme concernant le FPol est également dû à une impureté présente avec celui-ci. De même, le léger épaulement vers 16 min du pic correspondant au FHQ est présent quand on injecte le FHQ seul.

On constate par ailleurs que dans le cas du FHB, l'aire sous le pic déterminée correspond à la concentration en analogue de substrat attendue si celui-ci n'a pas réagi. En revanche, concernant le FHQ et le FPol, on n'obtient qu'environ les deux tiers du signal attendu. Ces deux composés étant moins solubles que le FHB, il est probable qu'ils aient en partie précipité avec le culot protéique lors de la centrifugation de l'échantillon. En effet, lorsqu'on resuspend le culot obtenu dans un mélange tampon/EtOH/ACN (50:25:25) et qu'on analyse la solution obtenue par HPLC, on peut détecter du FHQ ou du FPol selon les cas. Il est donc également possible que si activité il y a eu, le produit formé ait également été piégé dans le culot protéique.

L'activité de Coq6 n'est donc pas détectable dans les conditions utilisées mais il serait intéressant d'analyser les échantillons par une méthode plus sensible comme la spectrométrie de masse.



Figure 60 : Test enzymatique avec la forme monomérique de Δ1-24Coq6 en présence de NADPH, hAdR et ScAdx. Concentrations avant ajout de solution « stop » : Δ1-24Coq6 20 µM, NADPH 1,5 mM en tout, hAdR 20 µM, ScAdx 20 µM, analogue de substrat 500 µM dans tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. Au final, échantillon dans un mélange tampon/EtOH/ACN (50:25:25). Les croix rouge et bleu symbolisent les temps d'élution associés au FHB-OH et au FCat, respectivement.

Il est possible que le transfert à Coq6 d'électrons soit trop lent et que ScAdx, une fois réduite, soit réoxydée par l'oxygène de l'air plus rapidement qu'elle ne peut réduire Coq6. Nous avons donc décidé de mener la même série de tests, cette fois-ci avec un réducteur chimique, le dithionite, qui réduit de façon *quasi* instantanée la flavine de Coq6 pour s'affranchir de ce problème de vitesse de transfert d'électrons.

III.3) Réduction chimique

Comme précédemment, le substrat (500 μ M) a été incubé pendant 5 min en anaérobiose avec Coq6 de *S. cerevisiæ* (20 μ M). Par la suite, du dithionite de sodium (Na₂S₂O₄, 2 mM, 100 éq) est ajouté. Après cela, les échantillons sont ouverts à l'air 15 min sans agitation puis agités 15 min. A ce moment-là, le dithionite a été entièrement oxydé et Coq6 est à nouveau sous forme oxydée. Des études préalables ont permis de montrer que Coq6 était stable en présence de 100 éq de dithionite et qu'elle était réoxydée en présence de l'oxygène de l'air sans perdre sa flavine.

Après traitement, l'injection des échantillons en HPLC ne permet pas de détecter l'apparition d'un produit, exemple Figure 61 de chromatogrammes avec la forme monomérique de Δ 1-24Coq6. Dans tous les cas, les pics correspondants aux différents substrats sont toujours présents et on ne détecte pas de nouveaux pics.

Sur les chromatogrammes correspondant aux tests avec le FHQ et le FHB, on observe un pic révélateur de la présence des produits d'oxydation du dithionite. Ce pic est absent du chromatogramme correspondant au FPol car les conditions d'élution sont différents dans ce cas (cf. Tableau 12 page 146) : les molécules issues du dithionite sont probablement dans le pic d'injection.

Concernant la concentration en analogue de substrat, on constate le même phénomène que lors des tests avec hAdR et ScAdx. Les concentrations déterminées pour FHQ et FPol sont moins importantes que celles auxquelles on s'attendait en cas de non catalyse des analogues et on détecte la présence des composés dans le culot protéique.

L'activité de Coq6 n'est donc pas détectable dans les conditions utilisées mais il serait intéressant d'analyser les échantillons par une méthode plus sensible comme la spectrométrie de masse.



Figure 61 : Test enzymatique avec la forme monomérique de Δ1-24Coq6 en présence de dithionite. Concentrations avant ajout de solution « stop » : Δ1-24Coq6 20 μM, dithionite 2 mM, analogue de substrat 500 μM dans tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. Au final, échantillon dans un mélange tampon/EtOH/ACN (50:25:25). Les croix rouge et bleu symbolisent les temps d'élution associés au FHB-OH et au FCat, respectivement.

En solution, le dithionite peut facilement dismuter : l'espèce produite réagit très rapidement avec l'oxygène en solution pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS), cf. Schéma 33. Il est donc possible que le dithionite consomme tout l'oxygène se dissolvant dans l'échantillon lors de la réouverture à l'air et que, de fait, l'oxygène n'ait pas le temps de former le peroxyde de flavine avec le FAD de Coq6 : la réaction d'hydroxylation ne peut donc pas se faire. De plus, les ROS peuvent réagir avec l'enzyme et perturber encore plus la réaction.

Schéma 33 : Réaction du dithionite avec le dioxygène en solution aqueuse. (Creutz et Sutin 1974)

Nous avons donc décidé de mener une série d'expérience avec de la déazaflavine (DAF) afin de photoréduire la flavine de Coq6.

III.4) Réduction photochimique par la déazaflavine

La 5-déazariboflavine, couramment appelée déazaflavine, a été utilisée pour photoréduire le FAD de Coq6. Il s'agit de riboflavine dont le noyau isoalloxazine a été modifié afin de remplacer l'azote 5 du cycle par un carbone. En présence d'EDTA comme donneur sacrificiel d'électrons et sous irradiation, elle est réduite et est capable de réduire les flavines au sein des protéines (Massey *et* Hemmerich 1978), cf. Schéma 34.



Schéma 34 : Formules chimiques de la riboflavine et de la déazariboflavine.

Dans les contions utilisées, cf. partie III.4.a du chapitre II page 57, 2 min d'irradiation en anaérobiose suffisent à réduire totalement le FAD de Coq6. En l'absence de lumière, la réaction est stoppée. Lors de l'ouverture à l'air de l'échantillon, la déazariboflavine photoréduite, présente en quantité catalytique (au maximum 2 µM) va être oxydée par le dioxygène une seule fois. En absence de lumière, la déazariboflavine ne pourra plus être re-réduite et on évitera la réaction parasite entre l'oxygène de l'air et le réducteur utilisé. L'oxygène pourra donc réagir uniquement avec le FAD réduit de Coq6 et on pourra alors avoir formation du peroxyde de flavine puis du produit d'hydroxylation de façon « stoechiométrique ». En effet, avec une telle méthode, l'enzyme ne peut réaliser qu'un seul *turn over*.

Après traitement, l'injection des échantillons en HPLC ne permet pas de détecter l'apparition d'un produit, exemple Figure 62 de chromatogrammes avec la forme monomérique de Δ 1-24Coq6. Dans tous les cas, les pics correspondants aux différents substrats sont toujours présents et on ne détecte pas de nouveaux pics.

Concernant la concentration en analogue de substrat, on constate le même phénomène que lors des tests avec hAdR et ScAdx ou avec le dithionite. Les concentrations déterminées pour FHQ et FPol sont moins importantes que celles auxquelles on s'attendait en cas de non catalyse des analogues et on détecte la présence des composés dans le culot protéique.

L'activité de Coq6 n'est donc pas détectable dans les conditions utilisées mais il serait intéressant d'analyser les échantillons par une méthode plus sensible comme la spectrométrie de masse.



Figure 62 : Test enzymatique avec la forme monomérique de Δ1-24Coq6 en présence de déazaflavine.
Concentrations avant ajout de solution « stop » : Δ1-24Coq6 20 μM, déazaflavine 2 μM, analogue de substrat 500 μM dans tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 15 mM. Au final, échantillon dans un mélange tampon/EtOH/ACN (50:25:25). Les croix rouge et bleu symbolisent les temps d'élution associés au FHB-OH et au FCat, respectivement.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer cette absence d'activité détectable de

Coq6:

- le fait d'avoir un système de transfert d'électrons à Coq6 hétérologue pourrait diminuer drastiquement l'efficacité catalytique du système;
- il est possible que trois unités isoprényles ne soient pas suffisantes pour que le substrat soit reconnu par l'enzyme;
- Coq6, qui fait partie d'un complexe protéique *in vivo*, pourrait avoir besoin de ses partenaires pour adopter une conformation permettant l'hydroxylation;
- Coq6 se situant à la membrane interne de la mitochondrie, il est possible que le substrat doive être solubilisé dans la membrane pour être dans une conformation réactive.

IV) Etude en fluorescence de la liaison de Coq6 aux analogues de substrat

Afin d'étudier la liaison des différents analogues de substrat synthétisés au FAD de Coq6 de *S. cerevisiæ*, nous avons réalisé des études d'extinction de fluorescence, cf. partie V.3 du chapitre II page 78.

L'inhibition de fluorescence ou *quenching* apparaît quand des molécules interagissent avec la molécule siège de la fluorescence (dans notre cas le FAD) : on a alors une diminution du signal de fluorescence. Il existe deux sortes de *quenching* : l'un est dit statique et l'autre dynamique.

Le phénomène de *quenching* statique se manifeste lorsque le fluorophore, F, interagit à l'état fondamental avec une autre molécule, Q : le complexe formé FQ n'est pas fluorescent. Si on considère que la fluorescence s'éteint complétement quand le complexe se forme et que l'intensité observée est uniquement due au fluorophore libre, on peut alors déterminer une constante de dissociation du complexe. En effet, le rapport I₀ (intensité de fluorescence en absence de Q) sur I (intensité de fluorescence en présence de Q) varie linéairement avec la concentration en Q, cf. Figure 63 : le coefficient directeur de la droite obtenue est l'inverse de la constante de dissociation du complexe. Généralement, lorsqu'on a liaison d'un substrat à une flavoprotéine, c'est le type d'inhibition de fluorescence qu'on obtient.

Cependant, il existe également un phénomène de *quenching* dynamique qui se manifeste lorsque le fluorophore à l'état excité, F*, rencontre une autre molécule Q : la collision va faire retourner F à son état fondamental sans qu'il puisse émettre de photons. Ce phénomène est fréquent avec les ions chargés négativement. Dans ce cas également, le rapport I₀/I varie linéairement avec la concentration en Q, cf. Figure 63: le coefficient directeur de la droite obtenue permet alors de déterminer une constante de *quenching* appelée constante de Stern-Volmer. La seule façon de distinguer *quenching* dynamique et *quenching* statique est d'étudier la durée de vie de la fluorescence.

Dans certains cas, notamment lorsque la molécule inhibant la fluorescence est chargée négativement, il peut y avoir un mélange de *quenching* statique et de *quenching* dynamique. Dans ce cas, la relation de linéarité entre I₀/I et [Q] n'est plus valable. On peut alors considérer (Valeur 2001) que le « quenching » dynamique s'applique à la fraction de molécules fluorescentes (et donc non complexées). En traçant I₀/I en fonction de [Q], on obtient une parabole, cf. Figure 63, dont la modélisation permet de déduire la constante de dissociation du complexe et constante de Stern-Volmer.



Figure 63 : Représentation schématique des cas de *quenching* **statique ou de** *quenching* **dynamique ainsi que du cas d'un mélange de** *quenching* **statique et de** *quenching* **dynamique.** Q, molécule éteignant la fluorescence; I₀, intensité de fluorescence en absence de Q; I, intensité de fluorescence en présence de Q.

IV.1) Spectroscopie de fluorescence

Dans un premier temps, nous avons testé le FHB avec la forme tétramérique de MBP-Coq6. Un spectre d'émission de la protéine (1 μ M) en fixant λ_{ex} = 450 nm est réalisé. Le maximum d'émission se situe vers 520 nm. Le substrat (5 mM dans 10% DMSO) est ajouté petit à petit à la solution protéique.

On constate une extinction partielle du signal de fluorescence de la flavine lorsque la concentration en FHB augmente, cf. Figure 64 : on peut supposer que le FHB interagit avec le noyau isoalloxazine du FAD et éteint sa fluorescence.



Figure 64 : Influence du FHB sur la fluorescence de la flavine de MBP-Coq6. A. Spectres d'émission de la flavine de Coq6 à différentes concentration de FHB. B. Evolution du signal de fluorescence du FAD de Coq6 à 520 nm en fonction de la concentration en FHB. λ_{ex} = 450 nm, 1 μ M MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM.

Afin d'étudier l'importance de la chaîne isoprényle et de vérifier si l'extinction de fluorescence observée provient bien d'une interaction spécifique entre le FHB et le FAD de MBP-

Coq6, nous avons mené la même expérience avec le MHB : la chaîne farnésyle est remplacée par un méthyle, cf. Figure 65.



Figure 65 : Influence du MHB sur la fluorescence de la flavine de MBP-Coq6. A. Spectres d'émission de la flavine de Coq6 à différentes concentration de MHB. B. Evolution du signal de fluorescence du FAD de Coq6 à 520 nm en fonction de la concentration en MHB. λ_{ex} = 450 nm, 1 µM MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM.

On ne constate qu'une légère extinction du signal de fluorescence qui est beaucoup moins forte que celle observée en présence de FHB. La chaîne isoprényle s'avère donc importante pour la reconnaissance du substrat.

Une autre expérience a été menée pour vérifier si la seule présence d'une chaîne isoprényle sans noyau aromatique pouvait entraîner cette diminution de fluorescence, cf. Figure 66. Le FPP (Farnésyle PyroPhosphate) est alors ajouté à la forme tétramérique de MBP-Coq6. On constate effet similaire à celui observé avec le MHB : l'extinction de fluorescence observée est moins forte que celle observée avec le FHB. Le noyau aromatique est donc également important pour la reconnaissance du la molécule.



Figure 66 : Influence du FPP sur la fluorescence de la flavine de MBP-Coq6. A. Spectres d'émission de la flavine de Coq6 à différentes concentration de FPP. B. Evolution du signal de fluorescence du FAD de Coq6 à 520 nm en fonction de la concentration en FPP. λ_{ex} = 450 nm, 1 µM MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM.

Des tests ont également été réalisés avec du FAD ou du FMN libre en solution et du FHB : dans les deux cas, on n'observe pas d'extinction de la fluorescence du noyau isoalloxazine. On peut donc supposer que la combinaison de la chaîne isoprényle et du noyau aromatique induit une interaction du FHB avec le FAD lié à MBP-Coq6.

Par la suite, nous avons également étudié l'influence du FHQ sur la fluorescence du FAD contenu dans la forme tétramérique de MBP-Coq6, cf. Figure 67. On constate également une diminution de la fluorescence, plus prononcée qu'avec le FHB.



Figure 67 : Influence du FHQ sur la fluorescence de la flavine de MBP-Coq6. A. Spectres d'émission de la flavine de Coq6 à différentes concentration de FHQ. B. Evolution du signal de fluorescence du FAD de Coq6 à 520 nm en fonction de la concentration en FHQ. λ_{ex} = 450 nm, 1 µM MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM.

Lorsque l'on trace le rapport I_0/I à 520 nm en fonction de la concentration en analogue de substrat pour les données obtenues avec le FHB et le FHQ, on obtient les courbes présentées Figure 68.



Figure 68 : Comparaison de l'influence du FHB et du FHQ sur la fluorescence de la flavine de MBP-Coq6. Rapport à 520 nm de I₀ /I en fonction de la concentration en analogue de substrat pour les spectres enregistrés avec λ_{ex} = 450 nm, 1 µM MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM.

On remarque que les données présentées ne peuvent être modélisées ni par une droite, cas d'un *quenching* statique ou dynamique, ni par une parabole, cas d'un mélange de *quenching* statique et de *quenching* dynamique : on atteint une sorte de plateau quand la concentration en analogue de substrat augmente. Ceci peut être le signe de l'existence de plusieurs populations de fluorophores qui ne sont pas accessibles de la même façon. En effet, le spectre d'absorption UV-visible du FAD de la forme tétramérique de MBP-Coq6 ne possède pas d'épaulement marqué à 475 nm, ce qui laisse supposer qu'au moins une partie du FAD n'est pas bien lié à la protéine. Dans le cas du FHB, la possibilité d'un *quenching* dynamique résultant de la présence d'une charge négative est également à envisager. Il est à noter que la stabilisation du signal se fait en 5 à 10 min après les différents ajouts, ce qui est relativement lent.

Tous ces faits assemblés tendent à montrer que l'interaction entre MBP-Coq6 et ses analogues de substrat est relativement complexe. Etant donné que pour une même concentration en analogue, la fluorescence du FAD de MBP-Coq6 s'éteint plus en présence de FHQ qu'en présence de FHB, il est possible que le FHQ ait une meilleure affinité pour la protéine que le FHB et soit donc un meilleur analogue de substrat. Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec la forme monomérique de Δ 1-24Coq6 dont le spectre d'absorption UV-visible révèle un FAD bien lié à la protéine : cela nous permettrait peut-être de nous affranchir du problème des différentes populations de fluorophores.

IV.2) Fluorescence en stopped-flow

Lorsque nous avons obtenu la forme monomérique de Δ1-24Coq6, nous avons voulu étudier plus avant l'influence des différents substrats synthétisés sur la fluorescence du FAD de la protéine. Cette fois-ci, pour avoir également une idée de la vitesse d'extinction de la fluorescence du FAD par les analogues synthétisés, nous avons réalisé une expérience en *stopped flow*.

La longueur d'onde d'excitation est fixée à 445 nm et le signal de fluorescence est filtré pour récupérer uniquement le signal au-delà de 500 nm. Le FHQ éteint beaucoup plus rapidement la fluorescence du FAD de Δ 1-24Coq6 que le FHB et le FPol : la moitié de la fluorescence est éteinte en 10 s pour le FHQ contre à peine 10% pour le FHB et moins de 1% pour le FPol, cf. Figure 69A. Concernant le FHB et le FPol, si on réalise l'expérience sur un temps plus long, on constate que le FHB peut éteindre environ un tiers de la fluorescence du FAD de Δ 1-24Coq6 en 200 s, ce qui reste très lent, alors qu'en présence de FPol, le signal reste quasiment inchangé en fonction du temps, cf. Figure 69B.



Figure 69 : Comparaison de la diminution de la fluorescence de Δ 1-24Coq6 en fonction du temps en présence de 200 μ M de FHQ, FHB ou FPol. λ_{ex} = 450 nm, 1 μ M MBP-Coq6 tétramérique, tampon phosphate de sodium pH 7,5 5 mM, intensité initiale ramenée à 1 pour une meilleure comparaison des données. A. FHQ, FHB et FPol sur 10 s. B. FHB et FPol sur 200 s.

Le FPol ne semble donc pas un bon candidat comme analogue de substrat de Coq6 : il éteint très peu la fluorescence de son FAD. Concernant le FHB et le FHQ, même s'ils sont tous les deux capables d'éteindre la fluorescence du FAD de Coq6 de façon non négligeable, le FHB le fait sur une échelle de temps beaucoup plus longue que le FHQ : on peut supposer que le FHQ est un meilleur candidat comme analogue de substrat de Coq6 que le FHB. A noter que même pour le FHQ, l'extinction de la fluorescence se fait relativement lentement : il pourrait être intéressant de réaliser les mêmes expériences en solubilisant l'analogue de substrat dans une bicouche lipidique. En effet, le complexe protéique de biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* se situe à la membrane interne de la mitochondrie et il est possible que les différentes étapes de modification du noyau aromatique se fassent sur un intermédiaire ancré à la membrane par sa chaîne hexaprényle.

Les résultats obtenus sont préliminaires et permettent une première comparaison entre les substrats : il faudrait mener des expériences complémentaires, notamment par spectroscopie de fluorescence résolue en temps, afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu.

V) Conclusion

La synthèse d'analogues de substrat de Coq6 de *S. cerevisiæ* nous a permis de tester la réactivité de Coq6 avec différentes sources d'électrons. Cependant, malgré différents systèmes de réduction de Coq6, nous n'avons pu détecter d'activité enzymatique dans les conditions utilisées.

Des études préliminaires portant sur la fluorescence de la flavine de Coq6 en présence des différents analogues de substrat synthétisés montrent que le farnésylhydroquinone (FHQ) et l'acide 3-farnésyl-4-hydroxybenzoïque (FHB), contrairement au farnésylphénol (FPol), éteignent la

fluorescence du FAD de Coq6 de façon non négligeable. Par ailleurs, le FHQ éteint la fluorescence de Coq6 plus rapidement que le FHB. Ces constatations renforcent l'hypothèse de l'hexaprénylhydroquinone (HHQ) comme substrat de Coq6 plutôt que l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB).

L'absence d'activité enzymatique *in vitro* détectable de Coq6 dans les conditions utilisées pourrait s'expliquer par le manque d'un ou plusieurs partenaires protéiques de Coq6. En effet, Coq6 fait partie d'un complexe protéique situé à la membrane interne de la mitochondrie et il est possible qu'elle ait besoin de ses partenaires au sein du complexe pour se trouver dans une conformation active : des tests d'activité enzymatique incluant des extraits mitochondriaux de *S. cerevisiæ* pourraient s'avérer intéressants à entreprendre. Par ailleurs, il est probable que la modification du noyau aromatique attaché à la chaîne polyisoprényle se fasse alors que celle-ci est ancrée dans la membrane : Coq6 a peut-être besoin d'un substrat solubilisé dans une bicouche lipidique et il pourrait donc être intéressant de mener des essais enzymatiques en présence de différents lipides.

Il est néanmoins à noter que jusqu'ici aucune équipe n'a pu mesurer d'activité enzymatique *in vitro* avec les flavoprotéines (UbiF, UbiH, UbiI, monooxygénases, UbiX, UbiD, supposées décarboxylases) faisant partie du complexe de la biosynthèse de l'ubiquinone.

CHAPITRE VI : Caractérisation cinétique de l'adrénodoxine réductase humaine : effet du Mg²⁺

I) Introduction

Nous avons étudié plus en détail la cinétique de réduction de la flavine (FAD) de l'adrénodoxine réductase humaine (hAdR) par le NADH et le NADPH. Cette enzyme est très importante dans différents processus métaboliques et peu d'études cinétiques sont présentes dans la littérature jusqu'à présent.

Chez les mammifères, l'adrénodoxine réductase peut transférer les électrons du NADPH à deux adrénodoxines différentes : Fdx1 et Fdx2. Dans les glandes surrénales, Fdx1 intervient dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes en transférant ses électrons aux cytochromes P450 mitochondriaux (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2). Fdx2, quant à elle, est ubiquitaire et intervient dans la synthèse de l'hème A et des centres Fe-S (Sheftel *et al* 2010). L'adrénodoxine réductase possède des motifs caractéristiques de liaison au FAD ainsi qu'au NADPH, cf. Figure 70.



 Figure 70 : Alignement des séquences peptidiques des adrénodoxines réductases humaine, bovine et de S. cerevisiæ ainsi que de FprA de M. tuberculosis, homologue bactérien, à l'aide du logiciel ClustalW.
L'adrénodoxine réductase de bœuf (code PDB 1E1L) et FprA (code PDB 1LQT) ont été cristallisées avec leurs cofacteurs FAD et NADP⁺.

Comme nous l'avons vu dans la partie II.1.c.ii du chapitre IV des Résultats, l'adrénodoxine réductase humaine stabilise une forme semiquinone neutre du FAD lorsqu'elle est réduite par le NADPH. L'adrénodoxine réductase de boeuf (bAdR) possède également cette propriété.

Des études cinétiques en stopped-flow réalisées sur bAdR (Sugiyama *et al.* 1979) ont montré que la réduction du FAD de la protéine par le NADH ou le NADPH passait par la formation d'un complexe de transfert de charge possédant une bande d'absorption spécifique vers 530 nm, cf. Schéma 35 (l'hypothèse était alors l'existence d'un seul complexe de transfert de charge). Lorsque bAdR est réduite par le NADH, la première phase de formation du complexe de transfert de charge est suffisamment lente pour être observée et il est possible de déterminer k₁, k₋₁ et k₂, en supposant que k₋₂ est négligeable car le transfert d'hydrure est irréversible (k₁ = 0,18 μ M⁻¹s⁻¹, k₋₁ = 19 s⁻¹, soit K_d ≈ 90 μ M, et k₂ = 16 s⁻¹). Cependant, aux concentrations de NADPH utilisées, la première phase est trop rapide pour être étudiée et la constante de vitesse observée pour la réduction de la flavine ne varie pas et est de l'ordre de 20 s⁻¹.

bAdR-FAD + NAD(P)H
$$\underset{k_{-1}}{\overset{k_{1}}{\longleftarrow}}$$
 bAdR-FAD : NAD(P)H $\underset{k_{-2}}{\overset{k_{2}}{\longleftarrow}}$ bAdR-FADH₂ + NAD(P)⁺
 k_{-1} CT, 530 nm k_{-2}

Schéma 35 : Mécanisme proposé par Sugiyama et al. pour le transfert d'hydrure (H⁻) du NAD(P)H à bAdR.

FprA est un homologue bactérien des adrénodoxines réductases eucaryotes, elle possède respectivement 39 and 40% d'identité de séquence avec bAdR et hAdR, cf. Figure 70, et serait capable de transférer des électrons aux cytochromes P450 de *M. tuberculosis*. Des études menées sur FprA de *Mycobacterium tuberculosis* ont permis de montrer qu'elle possède des propriétés spectroscopiques similaires à bAdR, notamment l'apparition de la forme semiquinone neutre à l'ajout d'un excès de NADPH (Fischer *et al.* 2002). De plus, FprA possède une spécificité pour le NADPH comparé au NADH et un comportement similaire à bAdR vis-à-vis du NADH en *stopped flow* (McLean *et al.* 2003), ce qui a permis de déterminer des valeurs de constantes de vitesse microscopiques semblables à celles obtenues pour bAdR ($k_1 = 0,14 \mu M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1} = 6 s^{-1}$, soit $K_d \approx 40 \mu M$, et $k_2 = 18 s^{-1}$, Pennati *et al.* 2006).

Concernant le NADPH, comme pour bAdR, la phase de formation du complexe de transfert de charge est trop rapide et ne peut être observée. Cependant, à des faibles concentrations de NADPH (non testées dans le cas de bAdR), les auteurs ont pu constater un comportement atypique : les constantes de vitesse associées au transfert d'hydrure ne varient pas selon une équation de type Michaelis mais diminuent lorsque la concentration en NADPH augmente pour atteindre un plateau et il n'est alors pas possible de déterminer un K_d , cf. Figure 71A.

Une première hypothèse pour expliquer ce phénomène était la présence d'un second site de fixation du NADPH sur la protéine qui ne serait pas actif pour le transfert d'hydrure au FAD (McLean *et al.* 2003). Une seconde hypothèse, basée sur des simulations des cinétiques obtenues, serait que le NADPH et le NADP⁺ possèdent une affinité particulière pour l'enzyme comparée à celle du NADH et du NAD⁺, et que la réaction de transfert d'hydrure est réversible dans le cas du NADPH (Daff 2004).

Cette seconde hypothèse est confortée par plusieurs constatations. Tout d'abord, l'étude des comportements cinétiques des mutants R199A et R200A de FprA a montré que ces deux arginines étaient très importantes pour la reconnaissance du NADPH mais pas pour celle du NADH (Sabri *et al.* 2009).

En effet, le mutant R199A, de même que le mutant R200A, changent drastiquement de comportement comparé à FprA non mutée en présence de NADPH. Les constantes de vitesse associées au transfert d'hydrure varient alors selon une équation de type Michaelis et il est possible de déterminer un *K*_d, cf. Figure 71. Le *K*_d obtenu est du même ordre que celui déterminé avec le NADH et FprA non mutée. Par ailleurs, les vitesses et *K*_d déterminés lors des expériences effectuées avec les mutants et le NADH sont similaires à ceux obtenus avec la protéine native, ce qui montre que seule l'interaction de la protéine avec le NADPH est affectée.



Figure 71 : Cinétiques de réduction du FAD de FprA non mutée et FprA R199A par le NADPH. Tampon phosphate de sodium pH 7,5 10 mM, FprA 10 μM, 30°C, suivi à 452 nm. **A FprA non mutée** (McLean *et al.* 2003) **B. FprA R199A** (Sabri *et al.* 2009)

Les arginines R199 et R200 sont donc essentielles à la reconnaissance du NADPH mais pas à celle du NADH. Elles sont par ailleurs présentes chez bAdR, ScAdR et hAdR. L'étude des structures cristallographiques de FprA et bAdR contenant le FAD et le NADP⁺ confirme l'importance de ces deux arginines : elles sont en effet en interaction avec le phosphate à la position 2' du ribose du NADP⁺, cf. Figure 72. Ce phosphate étant absent du NADH/NAD⁺, la présence de ces deux arginines peut expliquer l'affinité particulière du NADPH et du NADP⁺ pour FprA comparée à celle du NADH et du NAD⁺



Figure 72 : Interactions du phosphate 2' du NADP⁺ avec FprA et bAdR. Arginines en interaction avec le phosphate 2' du NADP⁺ entourées en jaune. **A. Structure du site actif de FprA de** *M. tuberculosis* résolue à 1,05 Å. (tirée de Sabri *et al.* 2009) **B. Structure du site actif de bAdR résolue à 1,85** Å.

Il nous a donc paru intéressant de travailler sur hAdR afin de voir si elle possédait les mêmes particularités vis-à-vis du NADPH et du NADH que bAdR et FprA. Nous avons réalisé des cinétiques à l'état stationnaire et étudié la formation des complexes de Michaelis entre hAdR et NADPH/NADH à l'état pré-stationnaire en *stopped-flow*. Nous avons également étudié l'influence sur ces cinétiques de Mg²⁺, ion contenu dans la cellule et connu pour interagir avec les phosphates. Les études en *stopped-flow* ont été réalisées et interprétées avec l'aide du Dr. D. Hamdane.

II) Etudes cinétiques du transfert d'hydrure du NAD(P) à hAdR

II.1) Etudes à l'état stationnaire

Dans un premier temps, nous avons réalisés des cinétiques à l'état stationnaire avec le ferricyanure ou le DCPIP comme accepteurs d'électrons, le transfert d'électrons entre hAdR et le cytochrome *c* étant impossible pour des raisons électrostatiques. On suit alors la réduction du DCPIP ou du ferricyanure par le NADPH ou le NADH catalysée par hAdR par spectroscopie UV-visible (cf. partie V.1 du chapitre II page 75).

Concernant le NADPH, cf. Tableau 13, le k_{cat} avec le ferricyanure comme accepteur (25 s⁻¹) est environ cinq fois plus rapide qu'avec le DCPIP comme accepteur (5 s⁻¹). Ce résultat est comparable à celui obtenu avec bAdR (Lambeth *et* Kamin 1976) et légèrement supérieur à ce qui est obtenu pour FprA (rapport d'environ trois, Fischer *et al.* 2002). On peut supposer que le ferricyanure étant un accepteur chargé négativement, il va mieux interagir avec l'adrénodoxine réductase chargée positivement en surface que le DCPIP qui est neutre. Le K_M de hAdR pour le NADPH déterminé avec le ferricyanure ou le DCPIP est sensiblement le même, de l'ordre de 3 μ M.

Par ailleurs, hAdR a une meilleure efficacité catalytique (k_{cat}/K_{M}) concernant la réduction du ferricyanure en présence de NADPH qu'en présence de NADH. La différence est essentiellement liée à une différence de K_{M} : le K_{M} de hAdR pour le NADPH est de 3,5 μ M contre 170 μ M pour le NADH. Ces différences sont similaires à celles constatées pour FprA et bAdR.

Accepteur d'électrons	k _{cat} (e ⁻ .s ⁻¹)	К _M pour NAD(P)H (μM)	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _M (e ⁻ .s ⁻¹ .μM ⁻¹)	К _М pour Accepteur (μМ)	k _{cat} /K _M (e ⁻ .s ⁻¹ .μM ⁻¹)
NADPH					
ferricyanure	25 ± 0,5	3,5 ± 0,5	9,6 ± 2	131 ± 16	0,19 ± 0,02
DCPIP	4,9 ± 0,2	3 ± 0,5	1,7 ± 0,2	222 ± 0,5	$0,022 \pm 0,001$
NADH					
ferricyanure	30 ± 0,5	170 ± 13	0,18 ± 0,02	12,8 ± 0,7	2,3 ± 0,3

Tableau 13 : Constantes cinétiques déterminées pour hAdR. hAdR 25 nM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM, volume total 500 μL. $K_{\rm M}$ pour NADPH déterminé avec 1000 μM de ferricyanure ou 400 μM DCPIP. $K_{\rm M}$ pour NADH déterminé avec 100 μM de ferricyanure. $K_{\rm M}$ pour accepteur déterminé avec 100 μM de NADPH ou 1500 μM NADH.

hAdR possède donc une meilleure affinité pour le NADPH que le NADH même si les k_{cat} sont sensiblement les mêmes (25 et 20 s⁻¹ avec le ferricyanure comme accepteur d'électrons).

II.2) Etudes à l'état pré-stationnaire (*stopped flow*)

II.2.a) Réduction par le NADH

L'étude de la formation du complexe de Michaelis (hAdR-FAD:NADH), qui est aussi le premier complexe de transfert de charge (CT1), a été réalisée en anaérobiose à 25°C et la réaction a été suivie à différentes longueurs d'onde (une à la fois) en spectroscopie d'absorption UV-visible en *stopped flow*, cf. partie V.2 du chapitre II page 76.

La réduction de la flavine, qui correspond à l'étape du transfert d'hydrure (H⁻), a été suivie à 450 nm par le mélange rapide de 15 μ M de hAdR-FAD et 800 μ M de NADH, cf. Figure 73. La réduction de hAdR-FAD en hAdR-FADH₂ se fait dans les premières 200 ms qui suivent le mélange et la simulation de la courbe par une exponentielle permet de déterminer une constante de vitesse apparente d'environ 24 ± 0,2 s⁻¹, ce qui est similaire au k_{cat} (30 ± 0,5 s⁻¹) déterminé pour la réduction du ferricyanure par le NADH à l'état stationnaire.



Figure 73 : Suivi à 450 et 530 nm de la réaction du NADH avec le FAD de hAdR en anaérobiose. hAdR 15 μM, NADH 800 μM, tampon phosphate de potassium pH 7,5 100 mM.

Quand on suit la réaction à 530 nm, on observe deux phases. La première phase dure environ 18 ms, durant laquelle l'absorbance augmente : elle correspond probablement à la formation du CT1 (hAdR-FAD + NADH \rightleftharpoons hAdR-FAD:NADH), cf. Figure 73. La seconde phase, quant à elle, est décroissante et correspond au transfert d'hydrure (hAdR-FAD:NADH \rightarrow hAdR-FADH₂ + NAD⁺). La simulation de la courbe obtenue par une somme de deux exponentielles permet de déterminer une constante de vitesse de 92 ± 3 s⁻¹ pour la première phase et de 26 ± 1,5 s⁻¹ pour la seconde, ce qui est cohérent avec la constante déterminée à 450 nm (24 s⁻¹). Nous n'avons pu détecter aucun signal lié au deuxième complexe de transfert de charge (CT2, hAdR-FADH₂:NAD⁺) à 700 nm, ce qui est cohérent avec une dissociation rapide du NAD⁺ de l'enzyme. On peut donc supposer que la réaction de transfert d'hydrure est l'étape cinétiquement limitante et proposer le schéma de réaction ci-après :

hAdR-FAD + NADH $\stackrel{k_1}{\longrightarrow}$ hAdR-FAD : NADH $\stackrel{k_2}{\longrightarrow}$ hAdR-FADH₂ : NAD⁺ $\stackrel{k_2}{\longrightarrow}$ hAdR-FADH₂ : NAD⁺ $\stackrel{k_2}{\longrightarrow}$ hAdR-FADH₂

Afin de déterminer les différentes constantes de vitesse microscopiques, la réduction du FAD de hAdR a été étudiée en faisant varier la concentration en NADH (50 à 1600 μ M). Les courbes obtenues à 450 et 530 nm ont été simulées respectivement avec une et deux exponentielles. Le tracé des constantes de vitesses relevées pour la réaction de transfert d'hydrure en fonction de la concentration en NADH donne une courbe hyperbolique avec un plateau à 30 s⁻¹ environ (k_{lim}) et une intersection avec l'axe des ordonnées proche de zéro, ce qui est cohérent avec une étape de

hAdR

réduction irréversible du FAD, cf. Figure 74A. Les constantes de vitesse associées à la formation du CT1 varient linéairement avec la concentration en NADH avec une pente de 0,064 ± 0,01 μ M⁻¹.s⁻¹ et une ordonnée à l'origine de C = 41 ± 3 s⁻¹, cf. Figure 74B.



Figure 74 : Détermination des constantes de vitesse microscopiques de la réduction du FAD de hAdR par le NADH en anaérobiose. hAdR 15 μM, tampon phosphate de potassium pH 7,5 100 mM. A. Constantes de vitesse observées à 450 nm en fonction de la concentration en NADH. B. Constantes de vitesses observées liées à la formation du CT1 en fonction de la concentration en NADH.

Avec ces données, on peut estimer les constantes de vitesse microscopiques associées au modèle présenté Schéma 36. La constante k_1 est de 0,064 ± 0,01 μ M⁻¹.s⁻¹ et k_{-1} est d'environ 11 s⁻¹ en considérant que C = $k_{-1} + k_{lim}$. La valeur de k_{lim} est attribuée à k_2 , environ 30 s⁻¹. La constante de dissociation du NADH ($K_d = k_{-1}/k_1$) peut alors être déterminée et vaut environ 170 μ M. On retrouve des constantes similaires à celles déterminées pour bAdR et FprA.

II.2.b) Réduction par le NADPH

Nous avons également étudié la réduction de hAdR par le NADPH à l'état pré-stationnaire. Dans un premier temps, le mélange rapide de 15 μ M de hAdR-FAD et de 800 μ M de NADPH a été suivi à 450 et 530 nm à 25°C. On observe la réduction du FAD de hAdR dans les premières 200 ms, cf. Figure 75. Dans les deux cas, on peut simuler la diminution de l'absorbance avec une seule exponentielle et les constantes de vitesse apparentes déterminées sont de 27 ± 0,5 s⁻¹ et 29 ± 0,8 s⁻¹ à 450 et 530 nm respectivement. Les constantes obtenues sont similaires à celles observées lors de la réduction du FAD de hAdR par le NADH : on peut donc supposer que l'étape de transfert d'hydrure se fait à la même vitesse dans les deux cas.


Figure 75 : Suivi à 450 et 530 nm de la réaction du NADPH avec le FAD de hAdR en anaérobiose. hAdR 15 μ M, NADPH 800 μ M, tampon phosphate de potassium pH 7,5 100 mM.

Par la suite, la réduction du FAD de hAdR a été étudiée en faisant varier la concentration en NADPH (25 à 1600 μ M) à 25°C. Les constantes de vitesse apparentes déterminées à partir des courbes obtenues à 450 nm ne varient pas selon une hyperbole classique : elles diminuent lorsque la concentration en NADPH augmente : on passe de 39,5 ± 0,5 s⁻¹ pour 25 μ M de NADPH à une valeur de 27 ± 0,3 s⁻¹ pour une concentration saturante de NADPH (1600 μ M), cf. Figure 76. Ce comportement ne nous a pas permis de déterminer les constantes de vitesse microscopique liées à l'interaction du NADPH avec le FAD de hAdR.

Lorsqu'on répète les mêmes expériences à 6°C, on constate un comportement similaire à celui observé à 25°C bien que les constantes de vitesse apparentes soient quatre fois plus faibles : les constantes diminuent toujours lorsque la concentration en NADPH augmente, cf. Figure 76.



Figure 76 : Constantes de vitesse observées à 450 nm lors de la réduction du FAD de hAdR par le NADPH en fonction de la concentration en NADPH à 6 et 25°C. hAdR 15 μ M, tampon phosphate de potassium pH 7,5 100 mM.

Un tel phénomène « d'inhibition » par le réducteur NADPH a déjà été observé dans le cas de la cytochrome P450 réductase, de la NO synthase et bien sûr de FprA. Le fait de ne pouvoir simuler la variation des constantes de vitesse en fonction de la concentration NADPH avec une équation de Michaelis serait lié à une réaction de transfert d'hydrure réversible due à une affinité forte du NADP⁺ pour la protéine réduite ainsi qu'à une possible liaison du NADP⁺ à la protéine oxydée (Daff 2004).

III) Interaction de l'adrénodoxine réductase avec le NADP+

Afin de vérifier la réversibilité du transfert d'hydrure et d'étudier l'affinité de hAdR pour le NADP⁺, une étude de l'oxydation de hAdR réduite par le NADP⁺ a été réalisée en *stopped flow* ainsi qu'une étude cinétique à l'état stationnaire de l'inhibition par le NADP⁺ de la réduction du ferricyanure par le NADPH.

III.1) Oxydation de hAdR réduite par le NADP+

hAdR (15 μ M) a été réduite avec une quantité stœchiométrique de dithionite puis mélangée rapidement avec un large excès de NADP⁺ (750 μ M), cf. Figure 77. Le signal à 450 nm augmente et on peut constater qu'une partie du FADH₂ (env. 30%) est réoxydée en 100 ms.



Figure 77 : Suivi à 450 nm de la réaction du NADP⁺ avec le FADH₂ de hAdR en anaérobiose. hAdR réduite 15 μ M, NADP⁺ 750 μ M, tampon phosphate de potassium pH 7,5 100 mM.

En simulant la courbe avec une exponentielle, on détermine une constante de vitesse apparente de 45 \pm 0,5 s⁻¹. Le transfert d'hydrure entre NADPH et le FAD de hAdR est donc réversible et on peut proposer le schéma de réaction suivant :

hAdR-FAD + NADPH
$$\stackrel{k_1}{\longrightarrow}$$
 hAdR-FAD : NADPH $\stackrel{k_2}{\longrightarrow}$ hAdR-FADH₂ : NADP⁺ $\stackrel{hAdR-FADH_2}{\longrightarrow}$ hAdR-FADH₂

Schéma 37 : Mécanisme proposé pour la réduction du FAD de hAdR par le NADPH.

La même expérience réalisée en présence de NAD⁺ ne permet pas d'observer de réoxydation de la flavine réduite de hAdR. Le phénomène de réversibilité du transfert d'hydrure semble donc lié au phosphate à la position 2' du ribose du NADPH/NADP⁺ qui lui confère une affinité particulière pour hAdR comparé au NADH/NAD⁺.

III.2) Effet inhibiteur du NADP+ sur le transfert d'électrons en steady state

Nous avons étudié l'influence de différentes concentrations en NADP⁺ sur la vitesse de réduction du ferricyanure par hAdR en présence de NADPH. Lorsque l'on représente les données obtenues selon Lineweaver-Burk, on constate que les droites simulées ont des ordonnées à l'origine quasiment identiques mais que leurs pentes respectives augmentent avec la concentration en NADP⁺, cf. Figure 78A. Le k_{cat} varie donc assez peu en présence de NADP⁺ alors que le K_{M} évolue et augmente lorsque la concentration en NADP⁺ croît : le NADP⁺ agit comme un inhibiteur compétitif de la réduction du ferricyanure par hAdR en présence de NADPH. Lorsqu'on trace les K_{M} obtenus en fonction de la concentration en NADP⁺, on obtient une droite : le rapport ordonnée à l'origine sur pente de la droite permet de déterminer un K_i du NADP⁺ pour hAdR d'environ 20 μ M.



Figure 78 : Détermination du *K***i du NADP⁺ pour hAdR en présence de NADPH.** hAdR 25 nM, ferricyanure 1 mM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. A. Représentation de Lineweaver-Burk des vitesses initiales obtenues en fonction de la concentration en NADPH à différentes concentrations de NADP⁺. B. *k*_{cat} et *K*_M déterminés en fonction de la concentration de la concentration en NADP⁺.

En plus de réagir avec la forme réduite de hAdR, le NADP⁺ possède donc une assez bonne affinité pour sa forme oxydée, ce qui peut contribuer à expliquer les données obtenues en *stopped flow* sur la réduction du FAD de hAdR par le NADPH.

IV) Effet du Mg²⁺ sur la réduction du FAD de hAdR

Mg²⁺ est un cation physiologique qui est souvent impliqué dans des interactions avec des phosphates chargés négativement de mono ou polynucléotides comme l'ARN de transfert. De nombreuses kinases et polymérases sont également dépendantes de ce cation. Comme le NADPH et le NADH possèdent plusieurs phosphates, il est possible que le Mg²⁺ interagisse avec les groupements phosphates de ces deux molécules de façon différente et empêche certaines interaction avec hAdR, cf. Schéma 38.



Schéma 38 : Interactions possibles du Mg²⁺ avec le NADPH et le NADH.

IV.1) Effet du Mg²⁺ lors des études cinétiques en steady state

Dans un premier temps nous avons étudié l'influence de différentes concentrations en MgCl₂ sur la vitesse de réduction du ferricyanure par hAdR en présence de NADPH ou de NADH. Lorsque l'on représente les données obtenues selon Lineweaver-Burk, on constate que les droites simulées ont des ordonnées à l'origine quasiment identiques mais que leurs pentes respectives augmentent avec la concentration en MgCl₂ que ce soit pour le NADPH ou pour le NADH, cf. Figure 79 A1 et B1. Le k_{cat} varie donc assez peu en présence de Mg²⁺ alors que le K_M évolue et augmente lorsque la concentration en Mg²⁺ croît. Cette augmentation est plus prononcée en ce qui concerne le NADPH que le NADH : le K_M pour le NADPH déterminé en présence de 100 mM MgCl₂ (26,5 μ M) est 7,5 fois plus élevé que celui déterminé en l'absence de MgCl₂ (3,5 μ M) contre 3 fois pour le

NADH (540 μ M contre 170 μ M), cf. Figure 79 A2 et B2. Dans les deux cas, le rôle du Mg²⁺ s'apparente à celui d'un inhibiteur compétitif est on peut déterminer un K_i d'environ 19 mM dans le cas du NADPH et d'environ 43 mM dans le cas du NADH.



Figure 79 : Effet de la présence de MgCl₂ sur la vitesse de réduction du ferricyanure par hAdR en présence de NADPH ou de NADH. hAdR 25 nM, ferricyanure 1 mM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.
A1. Représentation de Lineweaver-Burk des vitesses initiales obtenues en fonction de la concentration en NADPH à différentes concentrations de MgCl₂. A2. k_{cat} et K_M déterminés pour le NADPH en fonction de la concentration de Lineweaver-Burk des vitesses initiales obtenues en fonction de la concentration de la concentration de Lineweaver-Burk des vitesses initiales obtenues en fonction de la concentration en MgCl₂. B1. Représentation de Lineweaver-Burk des vitesses initiales obtenues en fonction de la concentration en NADH à différentes concentrations de MgCl₂. B2. k_{cat} et K_M déterminés pour la NADH en fonction de la concentration en MgCl₂.

On remarque que l'affinité de hAdR pour le NADPH semble plus affectée que celle pour le NADH en présence de Mg²⁺ : on peut émettre l'hypothèse que cette différence est liée au fait que le NADPH possède un phosphate supplémentaire comparé au NADH et donc un mode de liaison au Mg²⁺ en plus, cf. Schéma 38. La présence de Mg²⁺ empêcherait la liaison du NADPH *via* les phosphates de la liaison adénosine-ribose mais également *via* le phosphate à la position 2' du ribose qui joue un rôle clef dans la liaison du NADPH à hAdR en interagissant avec deux arginines.

IV.2) Effet du Mg²⁺ lors des études cinétiques en stopped flow

Afin de mieux confirmer l'effet observé de Mg²⁺ sur l'interaction de hAdR avec le NADPH/NADH, nous avons également réalisé des études en *stopped flow* de la réduction du FAD de hAdR par le NADPH et le NADH en présence de MgCl₂. Comme Mg²⁺ réagit avec le tampon phosphate en formant des précipités, nous nous sommes donc placés en tampon Tris-HCl.

IV.2.a) Etude en présence de NADPH

Dans un premier temps, nous avons étudié l'évolution du signal à 450 nm lors de réaction du NADPH avec le FAD de hADR pour différentes concentrations de MgCl₂. En l'absence de Mg²⁺, les courbes obtenues dans le tampon Tris-HCl ont la même allure que celles obtenues en tampon phosphate et on a une décroissance de la valeur des constantes de vitesse apparentes avec l'augmentation de la concentration en NADPH, cf. Figure 80. En revanche, lorsque 25 mM de MgCl₂ sont présents dans le tampon, on constate un changement radical de l'allure de la courbe représentant la valeur des constantes de vitesse apparentes déterminées à 450 nm en fonction de la concentration en NADPH : on retrouve une forme d'hyperbole.

La présence des ions Mg²⁺ affecte donc bien l'interaction du NADPH avec le FAD de hAdR et, en simulant la courbe par $k_{obs}([S]) = \frac{k_2[S]}{K_d + [S]}$, on peut estimer un K_d d'environ 5 µM entre NADPH et FAD de hAdR et un k_2 de 36 s⁻¹ en présence de 25 mM de MgCl₂. Pour 50 et 100 mM de MgCl₂, l'effet est encore plus prononcé et on peut estimer des un K_d d'environ 11 et 38 µM et des k_2 de 32 et 36 s⁻¹, respectivement. Dans tous les cas, la vitesse de transfert d'hydrure, contrairement à l'affinité du NADPH pour hAdR, n'est pas affectée, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en *steady state*.



Figure 80 : Constantes de vitesse observées à 450 nm en fonction de la concentration en NADPH à différentes concentrations de MgCl₂. hAdR 12,5 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

En l'absence de MgCl₂, il n'était pas possible d'observer la formation du CT1 à 530 nm. Cependant, la présence des ions Mg²⁺ diminuant l'affinité du NADPH pour hAdR, on peut supposer que la vitesse de formation du premier complexe de transfert de charge est également affectée vu que K_d et constantes de vitesse microscopiques associées à la formation du CT1 sont liés. Afin de le vérifier, nous avons répété les expériences en présence de 25, 50 et 100 mM de MgCl₂ en suivant le signal à 530 nm. Nous nous sommes alors placés à une concentration en hAdR plus élevée afin d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.

A 25 mM MgCl₂, il est possible d'observer deux phases à 530 nm pour de faibles concentrations en NADPH (inférieur à 100 μ M) : au-delà la première phase est trop rapide. A de faibles concentrations de NADPH, la première phase reste très rapide et l'amplitude du signal est assez faible : il est donc difficile de simuler les courbes obtenues et de récupérer des constantes de vitesse apparentes exploitables. Pour deux équivalents de NADPH, on peut cependant observer une première phase croissante durant environ 9 ms avec une constante de vitesse apparente de $300 \pm 8 \text{ s}^{-1}$. Cette première phase est suivie d'une deuxième phase décroissante avec une constante de vitesse apparente de $42 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$, ce qui est similaire à la constante déterminée à 450 nm dans les mêmes conditions, $35 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, cf. Figure 81.



Figure 81 : Suivi à 450 et 530 nm de la réaction du NADPH avec le FAD de hAdR en présence de 25 mM MgCl₂ en anaérobiose. hAdR 25 μM, NADPH 50 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM, MgCl₂ 25 mM.

A 50 et 100 mM MgCl₂, la première phase est encore plus ralentie : on peut alors déterminer les constantes de vitesses apparentes pour les deux phases jusqu'à 200 et 400 μ M de NADPH respectivement, cf. Figure 82A. Au-delà de ces concentrations, la formation du complexe de transfert de charge est trop rapide et il n'est pas possible d'observer la première phase. Les

constantes de vitesses apparentes déterminées pour la formation du CT1 (k_{obs1}) varient linéairement avec la concentration en NADPH, cf. Figure 82B.



Figure 82 : Etude de la réaction du NADPH avec le FAD de hAdR en présence de 50 et 100 mM MgCl₂. hAdR 25 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM. **A. Suivi à 530 nm de la réaction du NADPH (25 à 200 μM)** avec le FAD de hAdR en présence de 50 mM MgCl₂ en anaérobiose. B.Constantes de vitesses observées liées à la formation du CT1 en fonction de la concentration en NADPH.

Le comportement observé est cohérent avec un modèle d'équilibre réversible simple entre NADPH et hAdR, cf. Schéma 39. Les pentes déterminées permettent alors d'évaluer la constante microscopique k_1 qui est de 2,6 μ M⁻¹s⁻¹ pour 50 mM MgCl₂ et de 1 μ M⁻¹s⁻¹ pour 100 mM MgCl₂. Les ordonnées à l'origine étant similaires, on peut en déduire que les différences de K_d observées viennent essentiellement de cette différence de k_1 et donc d'une « formation du complexe » plus lente quand la concentration en MgCl₂ augmente : l'interaction des ions Mg²⁺ avec les phosphates du NADPH empêche peut-être une bonne reconnaissance du substrat.

hAdR-FAD + NADPH
$$\stackrel{k_1}{\longleftarrow}$$
 hAdR-FAD : NADPH
 k_{-1} CT1, 530 nm

Schéma 39 : Modèle de formation du CT1 entre la NADPH et le FAD de hAdR

IV.2.b) Etudes en présence de NADH

Nous avons également étudié l'effet du MgCl₂ sur la réduction en anaérobiose du FAD de hAdR par le NADH. On constate que, comme pour le NADPH, le k_2 n'est pas influencé quand on passe de 0 à 50 mM de MgCl₂, cf. Figure 83, mais que l'affinité du NADH pour hAdR change avec un K_d 5 fois plus important à 50 mM de MgCl₂ (900 ± 50 μ M) qu'à 0 mM (160 ± 7 μ M).



Figure 83 : Constantes de vitesse observées à 450 nm en fonction de la concentration en NADH à 0 et 50 mM MgCl₂. hAdR 25 μM, tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM.

Le NADH, comme le NADPH, possède une affinité plus faible pour hAdR en présence de MgCl₂.

V) Conclusion

Grâce aux études réalisées en *steady state* et en *stopped flow*, nous avons pu caractériser la réduction de l'adrénodoxine réductase humaine par le NADH et le NADPH.

Tout d'abord, nous avons constaté que hAdR possédait un comportement similaire à celui de deux autres adrénodoxines réductases : bAdR (89% d'identité de séquence) et FprA (40% d'identité de séquence). En effet, son donneur préférentiel d'électron est le NADPH : hAdR possède une meilleure affinité pour le NADPH que pour le NADH. De plus, les constantes de vitesse microscopiques déterminées pour la réduction du FAD de hAdR par le NADH en anaérobiose sont similaires à celles trouvées pour bAdR et FprA ($k_1 = 0,064 \mu M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1} = 11 s^{-1}$, $K_d \approx 170 \mu M$, et $k_2 = 30 s^{-1}$)

Concernant la réduction par le NADPH du FAD de hAdR dans les mêmes conditions, la formation du CT1 est trop rapide pour être étudiée et les constantes de vitesses apparentes déterminées pour le transfert d'hydrure ne varient pas selon une courbe de Michaelis mais décroissent quand la concentration en NADPH augmente. Ce phénomène est également décrit pour la cytochrome P450 réductase et la NO synthase et serait lié à une réaction de transfert d'hydrure réversible due à une affinité forte du NADP⁺ pour la protéine réduite ainsi qu'à une possible liaison du NADP⁺ à la protéine oxydée (Daff 2004). Nos expériences confortent ces

hypothèses vu que le NADP⁺, contrairement au NAD⁺, est capable d'oxyder hAdR réduite et qu'il possède une certaine affinité pour hAdR ($K_i \approx 20 \mu M$).

Enfin, nous avons mis en évidence l'influence très forte de Mg²⁺ sur le comportement de hAdR. Mg²⁺ est un cation présent à hauteur de 25 à 50 mM dans la cellule qui est connu pour interagir avec les fonctions phosphates, notamment des ARNt. Nous avons constaté que la présence de Mg²⁺ n'influence pas la vitesse de transfert d'hydrure mais affecte le $K_{\rm M}$ de hAdR pour le NADPH et le NADH : on peut supposer qu'il interagit avec leurs phosphates et gêne donc leur liaison. Cette perturbation de l'interaction du NADPH et de hAdR fait que, en présence d'au moins 50 mM de Mg²⁺, il est possible de caractériser la formation du CT1 et que le transfert d'hydrure entre le NADPH et le FAD de hAdR peut être décrit selon Michaelis. On peut alors déterminer une partie des constantes microscopiques associées à la réduction du FAD de hAdR par le NADPH ($k_1 = 2,6 \mu M^{-1}s^{-1}$, $K_d \approx 10 \mu M$, et $k_2 \approx 30 s^{-1}$ pour 50 mM MgCl₂). L'effet du Mg²⁺ *in vivo* serait peut-être d'empêcher une fixation « non productive » du NADPH au site actif de hAdR en diminuant son affinité pour celui-ci.

CONCLUSION GENERALE

Les connaissances actuelles sur l'étape d'hydroxylation en C-5 dans la biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* proviennent des travaux effectués par Fabien Pierrel et son équipe qui ont mis en évidence *in vivo* l'implication de Coq6, ScAdR et ScAdx dans cette étape. Par homologie de séquence, il a été possible de déterminer que Coq6 est une monooxygénase à flavine de classe A.

L'implication d'une adrénodoxine réductase et d'une adrénodoxine conjointement à une monooxygénase à flavine de classe A dans une étape d'hydroxylation aromatique est, à notre connaissance, un cas unique. Il existe certes deux exemples d'époxydases agissant sur des alcènes et nécessitant la présence d'une chaîne de transfert d'électrons pour fonctionner mais les monooxygénases à flavine de classe A sont généralement directement réduites par le NAD(P)H.

Par ailleurs, au vu des différents intermédiaires de la biosynthèse de l'ubiquinone isolés lors des études génétiques, il existe une ambigüité quant au groupement chimique présent en C-1 sur le substrat de Coq6, à savoir s'il s'agit d'un carboxyle ou d'un hydroxyle.

Notre but a donc été de mieux comprendre l'étape d'hydroxylation en C-5 dans la biosynthèse de l'ubiquinone chez *S. cerevisiæ* en réalisant pour la première fois des tests *in vitro*.

Durant ce travail, nous avons obtenu pour la première fois Coq6 de *S. cerevisiæ* sous forme soluble et monomérique avec son cofacteur FAD. Ceci a nécessité l'optimisation des conditions de surexpression et de purification de la protéine. La surexpression de la protéine fusionnée avec un la MBP à l'extrémité N-terminale en présence des chaperonnes GroES et GroEL ainsi que la suppression des 24 premiers acides aminés de la forme native, correspondant à la séquence d'adressage à la mitochondrie, ont au final permis d'obtenir 1 mg de protéine par litre de culture après le clivage du tag MBP.

La confirmation de la présence du FAD comme cofacteur de forte affinité au sein d'une poche hydrophobe a conforté l'hypothèse de Coq6 comme une monooxygénase à flavine à un composant.

Les études structurales commencées au laboratoire ont d'ores et déjà permis d'obtenir des cristaux de la forme tétramérique de MBP-Coq6. La faible résolution des clichés de diffraction enregistrés (5 Å) couplée au nombre élevé de molécules par unité asymétrique n'ont néanmoins pas permis la résolution de sa structure jusqu'à présent. Des constructions de Δ 1-24Coq6 avec un tag histidine sont en cours d'élaboration dans le but d'obtenir une protéine monomérique en grandes quantités pouvant cristalliser.

L'élaboration d'un modèle structural par homologie a néanmoins permis de proposer un site de liaison du FAD. Des analyses du modèle ont permis d'identifier un canal d'accès du substrat au site actif (canal également impliqué dans la liaison à la chaîne polyisoprényle), de souligner l'importance de la longueur de la chaîne polyisoprényle pour une affinité optimum du substrat et de soulever l'hypothèse qu'un groupement hydroxyle plutôt qu'un groupement carboxyle serait présent à la position C-1 du substrat de Coq6. Par ailleurs, l'origine du dysfonctionnement de la biosynthèse de l'ubiquinone chez certains patients, dû à la mutation ponctuelle G255R, pourrait être liée à l'obstruction d'un canal d'accès du substrat au site actif.

De façon inhabituelle pour une monooxygénase à flavine de classe A, nous n'avons pas pu réduire directement le FAD de Coq6 de *S. cerevisiæ* par le NADPH ou le NADH. Nous avons donc décidé d'étudier la chaîne de transfert d'électrons formée par l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine.

Des tests de surexpression et de purification de ScAdR, connue pour être difficilement purifiable, ne nous ayant par permis d'obtenir une protéine contenant un cofacteur, nous avons décidé de produire et étudier son homologue humain, hAdR, capable d'assurer le transfert d'électrons entre le NADPH et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*. Un travail d'optimisation des conditions de surexpression de hAdR a été nécessaire et nous a permis d'obtenir la protéine avec son cofacteur FAD à raison de 3 mg de protéine par litre de culture.

La surexpression et la purification de ScAdx ont permis d'obtenir la protéine avec son centre [2Fe-2-S] à raison de 25 mg de protéine par litre de culture.

Grâce à la purification de ces trois protéines, nous avons mis en évidence *in vitro* que Coq6 de *S. cerevisiæ* peut être réduite par une chaîne de transfert d'électrons allant du NADPH au FAD *via* l'adrénodoxine réductase humaine et l'adrénodoxine de *S. cerevisiæ*.

Nous avons observé un transfert d'électrons rapide entre hAdR et ScAdx, de l'ordre de 90 s⁻¹ (5400 min⁻¹), malgré un Kd faible d'environ 30 μ M. En revanche, le transfert d'électrons entre ScAdx réduite et Coq6 est trois ordres de grandeur plus lent, de l'ordre de 0,026 s⁻¹ (1,56 min⁻¹). Lorsque nous mettons en place le système de transfert d'électrons dans sa totalité (NADPH, hAdR, ScAdx, Coq6), la vitesse de réduction de la flavine de Coq6 est encore plus lente (0,006 s⁻¹ ou 0,36 min⁻¹) et probablement limitée par le transfert d'électrons de ScAdx à Coq6. Plusieurs hypothèses sont à envisager pour expliquer cette vitesse relativement lente. Il peut y avoir une compétition entre la formation d'un complexe hAdR : ScAdx et d'un complexe ScAdx : Coq6 ou

alors on peut envisager la nécessité d'un complexe ternaire AdR : Adx : Coq6 qui dans notre cas ne serait pas efficace car les protéines ne proviennent pas du même organisme. Enfin, il est possible que la présence du substrat et/ou d'une bicouche lipidique voire de la totalité du complexe protéique de biosynthèse de l'ubiquinone soient nécessaires pour que les protéines adoptent les conformations les plus efficaces et que la vitesse de réduction de la flavine de Coq6 soit optimale.

Par ailleurs, il serait intéressant de compléter l'étude de la chaîne de transfert d'électrons du NADPH à Coq6 en déterminant notamment le K_d de Coq6 pour ScAdx et en étudiant les potentiels rédox des trois protéines mises en jeu, vu qu'ils n'ont pas encore été déterminés à notre connaissance. L'idéal serait de pouvoir obtenir l'adrénodoxine réductase de *S. cerevisiæ* afin de réaliser l'étude de la chaîne de transfert d'électrons dans un système homologue.

L'obtention d'une chaîne de transfert d'électrons capable de réduire le FAD de Coq6 nous a conduit à mener des tests enzymatiques sur Coq6 avec des différents analogues de substrat.

L'identité chimique du substrat de Coq6 n'étant pas connue avec certitude, en particulier la nature du groupement en C-1 (carboxyle, hydroxyle ou proton), et la chaîne polyisoprényle étant importante pour la reconnaissance du substrat par l'enzyme, nous avons synthétisé trois analogues de substrats comportant trois unités isoprényles et les trois groupements chimiques proposés en C-1.

Malgré la diversité des substrats utilisés et l'essai de différents systèmes de réduction de Coq6, nous n'avons pu détecter d'activité enzymatique de Coq6 dans les conditions utilisées.

Néanmoins, des études préliminaires portant sur la fluorescence de la flavine de Coq6 en présence des différents analogues de substrat synthétisés montrent que le farnésylhydroquinone s'associe à Coq6 : ceci renforce notre hypothèse concernant la présence d'un groupement hydroxyle en position C-1 du substrat.

L'absence d'activité enzymatique *in vitro* détectable de Coq6 dans les conditions utilisées pourrait s'expliquer par le manque d'un ou plusieurs partenaires protéiques de Coq6. En effet, Coq6 fait partie d'un complexe protéique situé à la membrane interne de la mitochondrie et il est possible qu'elle ait besoin de ses partenaires au sein du complexe pour se trouver dans une conformation active : des tests d'activité incluant des extraits mitochondriaux de *S. cerevisiæ* pourraient s'avérer intéressants à entreprendre. En outre, il est probable que la modification du noyau aromatique attaché à la chaîne polyisoprényle se fasse alors que celle-ci est ancrée dans la membrane : Coq6 a peut-être besoin d'un substrat solubilisé dans une bicouche lipidique et il pourrait donc être intéressant de mener des essais enzymatiques en présence de différents lipides. Il est à noter que jusqu'ici aucune équipe n'a pu mesurer d'activité enzymatique *in vitro* avec les flavoprotéines (UbiF, UbiH, UbiI, monooxygénases, UbiX, UbiD, supposées décarboxylases) faisant partie de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone.

Au cours de nos travaux, nous avons également réalisé une caractérisation cinétique de la réduction du FAD de hAdR par le NADH et le NADPH. En effet, cette enzyme est très importante dans différents processus métaboliques et a été assez peu étudiée d'un point de vue cinétique jusqu'à présent.

Tout d'abord, nous avons constaté que hAdR possédait un comportement similaire à celui de deux autres adrénodoxines réductases : AdR de bœuf (89% d'identité de séquence) et FprA de *M. tuberculosis* (40% d'identité de séquence). En effet, hAdR possède une meilleure affinité pour le NADPH que pour le NADH. De plus, les constantes de vitesse microscopiques déterminées pour la réduction du FAD de hAdR par le NADH en anaérobiose sont similaires à celles trouvées pour bAdR et FprA ($k_1 = 0,064 \mu M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1} = 11 s^{-1}$, $K_d \approx 170 \mu M$, et $k_2 = 30 s^{-1}$)

Concernant la réduction par le NADPH du FAD de hAdR dans les mêmes conditions, la formation du CT1 est trop rapide pour être étudiée et les constantes de vitesses apparentes déterminées pour le transfert d'hydrure ne varient pas selon une courbe de Michaelis mais décroissent quand la concentration en NADPH augmente. Ce phénomène serait lié à une réaction de transfert d'hydrure réversible due à une affinité forte du NADP⁺ pour la protéine réduite ainsi qu'à une possible liaison du NADP⁺ à la protéine oxydée. Nos expériences confortent ces hypothèses vu que le NADP⁺, contrairement au NAD⁺, est capable d'oxyder hAdR réduite et qu'il possède une certaine affinité pour hAdR ($K_i \approx 20 \mu$ M).

Enfin, nous avons mis en évidence l'influence très forte de Mg^{2+} , cation présent à hauteur de 25 à 50 mM dans la cellule et connu pour interagir avec les fonctions phosphates, sur le comportement de hAdR. Nous avons constaté que la présence de Mg^{2+} n'influence pas la vitesse de transfert d'hydrure mais affecte le K_M de hAdR pour le NADPH et le NADH : on peut supposer qu'il interagit avec leurs phosphates et gêne donc leur liaison. Cette perturbation est plus importante concernant le NADPH que le NADH, probablement car le NADPH possède un phosphate de plus à la position 2 du ribose, phosphate connu pour interagir avec deux arginines de la protéine. De fait, en présence d'au moins 50 mM de Mg^{2+} , il est possible de caractériser la

formation du CT1 et le transfert d'hydrure entre le NADPH et le FAD de hAdR peut être décrit selon Michaelis. On peut alors déterminer une partie des constantes microscopiques associées à la réduction du FAD de hAdR par le NADPH ($k_1 = 2,6 \mu M^{-1} s^{-1}$, $K_d \approx 10 \mu M$, et $k_2 \approx 30 s^{-1}$ pour 50 mM MgCl₂).

L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis d'avancer sur la compréhension de l'étape d'hydroxylation aromatique en C-5 de la biosynthèse de l'ubiquinone. Nous avons confirmé *in vitro* l'implication inhabituelle de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine dans une chaîne de transfert d'électrons à Coq6, monooxygénase à flavine de cette étape. Des études enzymatiques ont permis d'avancer une hypothèse quant au substrat de Coq6 sans qu'il soit pour autant possible de détecter d'activité enzymatique de Coq6 dans les conditions utilisées. Enfin, nous avons caractérisé cinétiquement l'adrénodoxine réductase humaine en mettant en évidence le comportement particulier de cette enzyme avec le NADPH, notamment en présence de Mg²⁺.

Les conditions de la première purification Coq6 de *S. cerevisiæ* sous forme soluble et monomérique avec son cofacteur ainsi que le modèle bioinformatique réalisé au laboratoire ont fait l'objet d'une publication soumise à *PLOS Computational Biology.* Les travaux sur l'adrénodoxine réductase humaine vont également faire l'objet d'une publication.

ANNEXE

I) Figures supplémentaires

Class A

4-hydroxybenzoate 3-hydroxylase

3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase

3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase

4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase

4-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase

3-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase

4-hydroxyisophthalate Hydroxylase

2,6-Dihydroxypyridine 3-Hydroxylase

Imidazolacetate 4-Hydroxylase

PgaE

Squalene Monooxygenase

Class B

Dimethylaniline

Hydroxylase

Cyclohexanone

Monooxygenase

Cyclopentanone Monooxygenase

Monooxygenase

Phenylacetone

Ornithine

Hydroxylase

Monooxygenase

4-Hydroxyacetophenone

 Θ_{00}

Monooxygenase (FMO)

2-Hydroxycyclohexanone

H₃C

co,

CH2COO

H-COO

000



2,4-Dichlorophenol 6-hydroxylase

Melilotate Hydroxylase

Kynurenine 3-hydroxylase

4-Aminobenzoate

1-Hydroxylase Anthranilate Hydroxylase

Pentachlorophenol Monooxygenase

RebC

PhzS

2-Methyl-3-Hydroxypridine-5-Carboxylic Acid



Oxygenase

Lysine Hydroxylase



Class C

Luciferase 2,5 (3,6)-Diketocamphane 1,2 (1,6)-Monooxygenase

⁰000

Class D 4-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase

Phenol Monooxygenase

Class E

Styrene

Monooxygenase

Class F

Tryptophan

7(5)-Halogenase



HOH

сн₂снсоо

CH-COO

сн,снсоо



flèches représentent l'oxydation du NAD(P)H, la consommation d'une molécule de dioxygène et la libération d'une molécule d'eau. (Crozier-Reabes *et* Moran 2012)

Figure S2 : Mécanismes cinétiques proposés pour les monooxygénases à flavine de classes A à F. Pour une même classe, l'ordre des évènements concernant la réduction de la flavine ou l'hydroxylation du substrat peut varier dans certains cas. La liaison et le départ des substrats (flavine, dioxygène, substrat à hydroxyler S) sont représentés par des flèches verticales. E_R désigne la flavine réductase et E_M la monooxygénase dans le cas des monooxygénases à deux composants. Le transfert de la flavine réduite entre E_R et E_M est représenté par une flèche en arc de cercle quand celui-ci s'effectue par diffusion et par une flèche oscillante quand il s'effectue *via* un tunnel formé par la complexation de E_R et E_M. (Crozier-Reabes *et* Moran 2012)



Figure S3 : Comparaison du repliement general des monooxygénases à flavine de classe A. Le domaine I, représenté en gris, est le domaine de liaison au FAD. Le domaine II, en rouge, est situé à l'interface du site actif et contribue à la liaison de substrat. Le domaine III, en bleu, est supposé participer à l'oligomérisation de la protéine. Les protéines présentées proviennent des fichiers de la PDB : 1PBE (PHBH), 1FOH (PHHY), 2DKH (MHBH), 2QA1 (PgaE), 2QA2 (CabE), 2ROC (RebC), 2RGJ (PhzS), 2VOU (DHPH). (Crozier-Reabes *et* Moran 2012)

II) Article soumis à PLOS Computational Biology

Coenzyme Q biosynthesis: Evidence for a substrate access channel in the FAD-dependent monooxygenase Coq6

Alexandre Ismail ^{1, 2}, Vincent Leroux ³, Myriam Smadja ¹, Lucie Gonzalez ¹, Murielle Lombard ¹, Fabien Pierrel ^{4, 5}, Caroline Mellot-Draznieks ^{1,*}, Marc Fontecave ¹

¹ Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, UMR 8229 CNRS, Collège de France,

Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

² Sup'Biotech, IONIS Education Group, Villejuif, France

³ Paris Sciences et Lettres (PSL*), Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in

Biology (CIRB), INSERM U1050, Paris, France

⁴ Univ. Grenoble Alpes, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes,

Grenoble, France

⁵ CNRS, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Grenoble, France

* Corresponding author:

E-mail: caroline.mellot-draznieks@college-de-france.fr

Abstract

Coq6 is an enzyme involved in the biosynthesis of coenzyme Q, a polyisoprenylated benzoquinone lipid essential to the function of the mitochondrial respiratory chain. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this putative flavin-dependent monooxygenase is proposed to hydroxylate the benzene ring of coenzyme Q (ubiquinone) precursor at position C5. We show here through biochemical studies that Coq6 is a flavoprotein using FAD as a cofactor. Homology models of Coq6-FAD complex are constructed and studied through molecular dynamics and substrate docking calculations of 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol (4-HP6), a bulky hydrophobic model substrate. We identify a putative access channel for Coq6 in a wild type model and propose *in silico* mutations positioned at its entrance capable of partially (G248 and L382 single mutations) or completely (G248-L382 double-mutation) blocking the access of the channel to the substrate. Further *in vivo* assays support the computational predictions, thus explaining the decreased activities or inactivation of the mutated enzymes. This work provides the first detailed structural information of an important and highly conserved enzyme of ubiquinone biosynthesis.

Author summary

Coenzyme Q is an essential redox active lipid present in most living organisms and in tissues of multicellular eukaryotes, which acts as a key component in the mitochondrial respiratory chain. It consists of an aromatic head and a long hyprophobic isoprenyl chain and is synthesized by several enzymes within an obligated complex located at the inner membrane. Mutations in several human Q biosynthesis genes are responsible for a range of diseases that may be treated by oral supplementation of Q. Previous studies have established that Coq6, a predicted flavin-dependent monooxygenase, is responsible for the C5-hydroxylation reaction in Q biosynthetic pathway, assisted by the ferredoxin Yah1 and ferredoxine reductase Arh1. We establish here that in *Saccharomyces cerevisiae* Coq6p uses FAD as a cofactor. We then use a computational approach to construct homology models of Coq6p, followed by MD calculations of the FAD-Coq6p complexes. These models are further used to get insight into the catalytic site structure and a general tunnel system in Coq6p. A specific tunnel is identified and mutations are proposed *in silico* in order to prohibit its access to the substrate. The results of the *in vivo* study of selected mutants substantiate our computational predictions.

Introduction

Ubiquinone (coenzyme Q or Q) is an essential redox-active lipophilic molecule widely distributed from bacteria to mammals.[^{1, 2, 3}] It is a key component of the ATP-producing mitochondrial aerobic respiratory chain in which it shuttles electrons from complexes I and II to complex III. Q also functions as a membrane-soluble antioxidant as well as a cofactor for the proton transport function of uncoupling proteins, and recently was further shown to act as a membrane stabilizing agent improving osmotic-stress tolerance in the bacterium *Escherichia coli*.[⁴] A fully-substituted benzoquinone ring mediates Q redox properties. This head is linked to a polyprenyl tail whose length varies between living organisms and which confers lipid solubility and ensures anchorage to cell membranes.[⁵] In *Saccharomyces cerevisiae*, it is formed by six isopentenyl units (ubiquinone is therefore designated as Q_6), by 8 units in *E. coli* (Q_8) and by 10 in humans (Q_{10}). Q_{10} is well-known as a nutritional complement and a lipid-soluble antioxidant,[⁶] and is also used clinically to treat patients with coenzyme Q_{10} deficiencies.[⁷]

Ubiquinone biosynthesis corresponds to a highly-conserved pathway involving a large number of genes which are involved in the modification of a six-carbon ring derived from 4hydroxybenzoate (4HB) into a quinone via attachment of the polyprenyl chain followed by hydroxylations, O-methylations and a C-methylation.^[8] Despite seminal genetic and biochemical investigations on *S. cerevisiae* and *E. coli*,[^{9,10}] this pathway is far from being completely understood. Indeed, only a small number of the biosynthetic proteins (referred to as the Coq /Ubi families) have been isolated and characterized biochemically and structurally. Q₆ biosynthesis in S. cerevisae requires at least 12 such Coq proteins, namely Coq1p-Coq9p, Yah1p and Arh1p,[10,¹¹] and the recently-identified Coq11p.^{[12}] Several, if not all, of these proteins form a multi-protein complex associated with the mitochondrial inner membrane - the CoQ synthome - where the presence of every member is mandatory to properly produce Q₆.[¹³,¹⁴] Such functional and structural interdependence of yeast Coq proteins complicates the elucidation of the whole synthesis mechanism, with single Coq gene knockouts accumulating only early pathway intermediates. In this context we recently initiated a long-term project aimed at providing new insights into the structure and function of Coq proteins in yeast. Coq6p from S. cerevisiae is of particular interest. It was initially proposed to be a flavin-dependent hydroxylase, but it was unclear whether it was involved in C1 or C5 hydroxylations.^[15,10] However, genetic and biochemical studies in our group unambiguously established that it was specifically responsible for the C5 hydroxylation during Q₆ synthesis in yeast, with the unexpected assistance of Yah1 and

Arh1.^[16,17] Primary Q_{10} deficiency is a rare recessive disorder associated with mitochondrial dysfunction, encephalomyopathy, ataxia, and cerebellar atrophy.[^{18,19}] In addition, a recent clinical study of 13 patients identified 6 mutations on the homologous human COQ6 gene that cause steroid-resistant nephrotic syndrome with sensorineural deafness as a likely consequence of Q_{10} deficiency.[²⁰]

We report here the first biochemical characterization of yeast Coq6 which establishes that Coq6 is a flavoprotein using FAD as a cofactor. In the absence of any crystallographic threedimensional structure of this enzyme, we constructed several models using homology modeling followed by molecular dynamics simulations and analysis of the FAD-Coq6p model complexes. This step allowed the identification of potential channels for access of lipophilic substrates to the active site. Using substrate docking calculations, a number of key residues were proposed for mutagenesis in order to block access to the substrate. Functional *in vivo* assays of these sitedirected mutants are in agreement with our theoretical predictions, supporting the hypothesis that one particular Coq6p channel is involved in substrate binding. This work provides a molecular basis for further studies towards a deeper understanding of structure-function relationships with respect to Coq6p mutant dysfunctions.

Computational Methods

Manual homology modeling. The amino acid sequence of Coq6 was retrieved from the UniProt database (entry P53318).^{[21}] Sequence homologs for which an X-ray-derived structure is available were found using the Phyre2 server.^{[22}] The homologs with highest sequence homology (templates 4K22[²³] and 4N9X[²⁴]) were downloaded from the Protein DataBank [²⁵] and further submitted to a structure-based search using the DALI server, [²⁶]returning 2X3N [²⁷] as a structurally homologous template. Template-target alignment was performed using the DiscoveryStudio v3.1 (©Accelrys) [²⁸] molecular modeling platform in parallel with the ClustalO alignment tool.[²⁹] This process was facilitated by a reference multiple sequence alignment (MSA) of 119 Coq6 sequence homologs obtained by using the ConSurf server.^{30,31} This MSA was used to adjust a targettemplate alignment of Coq6 with 2X3N, 4K22 and 4N9X templates, which was passed to MODELLER[³², ³³, ³⁴] as implemented in DiscoveryStudio. Since each template has sub-optimal or missing coordinates for some regions, we only retained template residues with reliable coordinates in this alignment. Effectively, we partitioned the Coq6p target sequence into distinct regions, each inheriting coordinates from a different template or construction procedure. Secondary structure assignments for the largest missing segments (the si loop and the Coq6p-family insert) were generated using the Jpred server. [³⁵]

Automated homology modeling. In order to investigate alternative methods for template selection, alignment, and model generation, we used the I-TASSER[³⁶] and ROBETTA[³⁷] automated servers using their default parameters. The I-TASSER and ROBETTA comparative modeling servers follow the same basic steps of template search, alignment, and model building. Both methods use sequence profile scoring methods to find and select the most appropriate templates. The methodological differences between I-TASSER, ROBETTA and MODELLER have been recently reviewed.[³⁸]

Molecular mechanics setup. Protons were added using DiscoveryStudio at expected configurations for pH=7. The AMBER99SB-ILDN[³⁹] force field was used to provide molecular mechanics parameters to Coq6p. In order to build the three Coq6p-FAD complexes in a comparable fashion, FAD coordinates for all three models were imported from PHBH structure 1PBE[⁴⁰] and minimized after binding site rotamer adjustment. Force field parameters for the FAD co-factor were those used by Sengupta *et al.*[⁴¹] The General Amber Force Field (GAFF)[⁴²] with partial charges optimized at the 6-31G* level was employed for generating this data. The Coq6p-FAD complexes were put in a rhombic dodecahedron cell with walls 14 Å away, solvated with TIP3P[⁴³]

explicit water molecules with Na⁺ and Cl⁻ ions added at 0.157 M concentration as documented for the mitochondrial matrix. [⁴⁴]

Molecular dynamics. All Coq6p-FAD models including the single (Coq6p-G248R and Coq6p-L382E) and double mutants (Coq6p-G248R-L382E) were subjected to molecular dynamics simulations in order to assess their structural stability and perform conformational sampling. All calculations were performed with GROMACS v4.6.5[45,46] on a dual Xeon workstation with an Nvidia Tesla C2075 GPU. Bonds between heavy atoms and hydrogens were constrained using LINCS.[47,48] A Particle-Mesh-Ewald electrostatics scheme was employed,[⁴⁹] with a shifted potential for long range interactions using a Verlet cut-off scheme[⁵⁰] set at 10 Å. Models prepared as described above were first submitted to 300,000 steps of steepest descent minimization. Next, Coq6p heavy atoms were restrained and two 250 ps, 1 fs timestep, T = 300 K equilibration runs were performed. The first equilibration was performed in the NVT ensemble using the V-rescale Berendsen thermostat[51] with 0.1 ps relaxation time; the second equilibration was done in the NPT ensemble using the Parrinello-Rahman barostat[52] set at 1 atm. Constraints on Coq6p heavy atom positions were removed for production runs. All models were subjected to 20 ns MD, at a 2 fs timestep, with Coq6p-FAD and the solvent coupled separately to the V-rescale Berendsen thermostat (NVT ensemble, 300 K, 0.1 ps relaxation time).

MD trajectory analysis. Basic analyses such as root mean square deviation (RMSDs) and secondary structure fluctuations on the MD trajectories generated by GROMACS were performed using the appropriate VMD plugins, [⁵³] allowing both global and regional inspections. The variations of key interatomic distances were also monitored with VMD.

Analysis of reference conformations from the models. Coq6p evolutionary residue conservation was calculated with the ConSurf server[30,31] from the Coq6p sequence, generating a multiple sequence alignment of 119 homologs, and mapped on Coq6 homology models. An analysis of potential substrate access channels on Coq6p was performed using the CAVER plugin[⁵⁴] for PyMol[⁵⁵] using a shell depth of 6 Å and a shell radius of 6 Å, with starting coordinates set in front of the FAD isoalloxazine. Tunnels leading to the catalytic site were characterized by their diameter at their narrowest points as measured between pairs of specific residues. Maxima in tunnel diameters were used as a criterion in selecting conformations from MD trajectories for substrate docking. Other tunnels were manually discarded.

A receptor-based scoring function. In the absence of experimental enzyme-substrate complexes for Coq6p or homologs, a receptor-based scoring function was developed to identify catalytically-plausible receptor conformations, defined as similar to that of PHBH (PDB ID

1PBE).[40] The well-characterized binding mode of 4-HB (also called para-hydroxybenzoate, pHB) in this FAD-pHBH complex was used as a reference.[⁵⁶] The scoring function is applied to every frame of the MD trajectory, providing a criterion for selecting enzyme conformations compatible with catalytic substrate binding to be used in subsequent docking. Residues forming H-bonds with 4-HB in pHBH, *i.e.* S212, P293 and T294, were identified and their interatomic distances were used to create a 3D description of the catalytic site as bound to an aromatic substrate. The C4X FAD-atom was also used in the scoring function. The scoring function, S, was constructed as the sum of the differences between the catalytic site interatomic distances measured in the 1PBE crystal structure[40] and those sampled from MD simulations of the pHBH-FAD complex:

$S = \Sigma [d_{ij}(yCoq6) - d_{ij}(1PBE)]$

A low score indicates a high structural similarity between the substrate-bound PHBH active site in the 1PBE structure[40] and the substrate-free pHBH conformations sampled during MD.

Substrate docking on Coq6p-FAD models. AutoDock Tools 1.5.6[57] was used to prepare Cog6p-FAD and substrate model coordinate files for docking with AutoDock Vina.⁵⁸] Cog6p-FAD conformations were selected from MD trajectories using the criteria of channel diameter and the receptor-based scoring function previously mentioned. We used 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol (4-HP6) as a model substrate. Atoms were typed according to Vina's standard table with Gasteiger charges. Only polar hydrogens were represented explicitly, identifying their parent atoms as possible hydrogen bond donors. Docking was performed without water molecules. Standard Autodock Vina[58] scoring function terms and weights were used. Docking box dimensions were specified to restrict the receptor search volumes to the substrate access channels identified through the CAVER[54] calculations. Exhaustiveness was increased to 96 runs to ensure good sampling. Substrate conformations were randomized at the beginning of each run of iterative local search. These initial conformations were randomly perturbed and then locally optimized with the BFGS algorithm. Resulting conformations were evaluated by Vina's scoring function and selected according to the Metropolis criterion until convergence was obtained. Low-scoring conformations found during all runs were saved, clustered, and refined before being ranked again by Vina's scoring function. The top 9 binding modes falling within a range of 3 kCal/mol according to the scoring function were retained for analysis.

Experimental Methods

Strains and plasmids. BL21 (DE3) *E. coli* strains were purchased from Novagen. The pGro7 plasmid encoding the chaperones GroES and GroEL under the control of the inducible araB

promoter was purchased from TaKaRa Bio, Inc. (Japan). The pMal-c2X plasmid overexpressing MBP (Maltose Binding Protein) fusion protein was purchased from New England Biolabs. The *coq6* gene from *S. cerevisiae* was optimized (Eurogentec) for expression in *E. coli* (**Fig. S1**) and then cloned in the pMAL-c2X expression vector between restriction sites BamHI and EcoRI, downstream the malE gene of *E. coli*.

The yeast plasmid pCM189 containing the *coq6* ORF under the control of its own promoter (pCoq6 plasmid) has been described[⁵⁹] as well as the G248R mutant (pCoq6-G248R plasmid). Mutagenesis of *coq6* to introduce the L382E mutation was performed in two steps. First, two complementary mutagenic oligonucleotides, 3'L382Ecoq6 and 5'L382Ecoq6 (**Table S1**), were each used in combination with an oligonucleotide complementary to the 5' end (SacI coq6) and 3' end (HindIII coq6) of *coq6*, respectively. The mutagenic oligonucleotides were designed such that leucine 382 is changed to a glutamate residue. The PCR reactions using oligonucleotides 3'L382Ecoq6 and SacI coq6 and oligonucleotides 5'L382Ecoq6 and HindIII coq6 yielded the DNA fragments *coq6-1* and *coq6-2*, respectively. The matrix used was pCoq6 or pCoq6-G248R. In the second step *coq6-1* and *coq6-2* were hybridized and used as templates for PCR amplification with the pair of oligonucleotides SacI coq6 / HindIII coq6. The resulting SacI-HindIII fragment was cloned into digested pCoq6, yielding the plasmids pCoq6-L382E and pCoq6-G248R-L382E. All constructs were verified by DNA sequencing.

Yeast strain, transformation and media. The yeast $\Delta coq6$ strain ($\alpha W303\Delta COQ6-2$) used for the complementation experiments with the Coq6 alleles has been described elsewhere.[⁶⁰] DNA transformations were performed with the PEG-lithium acetate method as previously reported.[⁶¹] The cells were grown in YNB without pABA and folate (MP Biomedicals) supplemented with amino acids and nucleobases to cover the yeast auxotrophies except for uracil since the plasmids carry the URA3 gene. For solid media, 1.6% bacto-agar was added. 0.2% glucose and 2% galactose were used as carbon sources for pre-cultures. The pre-cultures were inoculated (100 fold dilution) into medium containing 2% lactate-2% glycerol for Q quantification or 2% galactose for the serial dilution phenotypic assay.

Expression and purification. Overexpression of the Coq6p-MBP fusion protein (Coq6p-MBP) was achieved by using BL21 (DE3) *E. coli* strain co-transformed with pMALc2x-Coq6p and pGro7. The cultures were grown in LB medium at 37°C in the presence of glucose (0.2%), ampicillin (100 μ g/ml) and chloramphenicol (34 μ g/ml) until they reached OD₆₀₀ = 0.4 for induction of the chaperones GroES/EL with L-arabinose (2 mg/ml). When they reached OD₆₀₀ = 0.8, cells were shifted to 18°C and the expression of Coq6p-MBP was induced by the addition of IPTG (150 μ M).

After overnight incubation at 18°C, cells were harvested by centrifugation. All subsequent operations were carried out at 4°C. The cell pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol (v/v) in the presence of the protease inhibitor (cOmplete EDTA-free, Roche Life Science). After sonication, the lysate was submitted to ultracentrifugation at 180,000 x g for 90 min, at 4°C. The resulting supernatant was loaded onto an MBPTrap HP affinity column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 5% glycerol (v/v). Coq6p-MBP was eluted with a maltose gradient (0-25 mM) and loaded onto a Superdex 200 (26/60) column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 5% glycerol (v/v). The protein was concentrated with spin concentrators (Vivaspin 30-kDa cutoff) up to 10 mg/ml in the same buffer, frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C.

Biochemical characterization. The molecular mass of Coq6p-MBP was determined using a gel filtration column (Superdex 200 10/300 GL) calibrated with standards of known molecular mass (Bio-Rad). The nature and occupancy of the Coq6p-MBP cofactor were determined using HPLC and UV-visible spectrophotometry. Following denaturation (100°C for 10 min) and precipitation of the protein, the supernatant was analyzed on a Hypersil Gold C18 analytical column, with comparison to standard solution of FAD and FMN. The flavin content of the solution was determined by UV-visible spectrophotometry, using the known extinction coefficient of FAD ($\epsilon_{450nm} = 11300 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Absorption spectra were recorded on a Cary 60 UV-Vis spectrophotometer apparatus (Agilent).

Q extraction and quantification. Cells from cultures at OD_{600} ~2 were collected by centrifugation, washed once with ice cold water and their wet weight was determined in preweighted Eppendorf tubes before freezing at -20°C. Glass beads (100 µL), 50 µL KCl 0.15 M, a Q₄ solution (4 µM in methanol, 2 µL/mg of wet weight) and 0.6 mL methanol were added to cell pellets (10-30 mg wet weight). Tubes were vortexed for 10 min. Neutral lipids were extracted by adding 0.4 mL petroleum ether (40°-60° boiling range) and by vortexing for 3 min. The phases were separated by centrifugation (3 min, 1000g, room temperature). The upper petroleum ether layer was transferred to a fresh tube. Petroleum ether (0.4 mL) was added to the glass beads and methanol–containing tube, and the extraction was repeated once more. The petroleum ether layers were combined and dried under argon. The lipids were resuspended in 100 µL methanol, and aliquots were analyzed by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) on a Dionex U3000 system equipped with a C18 column (Betabasic-18, 5 µm, 4.6 x 150 mm, Thermo Scientific) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was 5% isopropanol, 20% acetonitrile, 75% of (98% methanol and 2% 1M ammonium acetate in water). Quinones were quantified with an ESA Coulochem III electrochemical detector (ECD) and a 5011A analytical cell (E1, -550 mV; E2, 550 mV). Hydroquinones present in samples were oxidized with a precolumn 5020 guard cell set in oxidizing mode (E, +600 mV). The standard Q_4 solution was injected in the same conditions to generate a standard curve which was used to correct for sample loss during the organic extraction (on the basis of the recovery of the Q_4 internal standard) and to quantify Q_6 .

Results

Purification and characterization of Coq6p. Coq6p was overexpressed in the presence of GroES and GroEL chaperones, and purified as an N-terminal MBP-tagged protein (named Coq6p-MBP) with a molecular mass of 96 kDa (**Fig. 1A**). Gel filtration experiments indicated that the protein formed tetramers and high molecular weight oligomers that could be further separated. The yellow colour of the tetrameric Coq6p-MBP and its UV-visible spectrum with characteristic absorption bands at 370 nm and 446 nm (**Fig. 1B**) show that it contains a flavin cofactor. The flavin extracted from Coq6p-MBP was identified as flavin adenine dinucleotide (FAD) based on its coelution on HPLC with commercial standard (not shown). FAD occupancy was estimated at 85% in the tetrameric Coq6p-MBP by UV-vis spectroscopic analysis.

Figure 1. Coq6p biochemical characterization. A) SDS PAGE (4-12% Bis-Tris, MOPS). Lane 1, Molecular Weigths (kDa); lane 2, BL21 DE3 cells transformed with pMALc2X-Coq6 before IPTG induction; lane 3, cells after 20 hr-IPTG induction at 18°C; lane 4, Coq6p-MBP (96.3 kDa) after a two-step purification (MBP trap, Superdex200 26/60). B) UV-visible spectrum of purified Coq6p-MBP, 1.20 mg/ml.

Summary of the modeling strategy. The modeling strategy is divided into four successive sections, whose results are presented and analyzed separately. First, we created homology models of Coq6p. We used two distinct approaches: one where template selection, template-target alignment, and model refinement steps are done with maximal user intervention using MODELLER[32-34] and the other using two highly ranked servers, ROBETTA and I-TASSER,[^{62, 63}] that fully automate these processes. At this stage, the FAD co-factor was introduced after model construction, as detailed in Methods. Second, the three Coq6p-FAD models were subjected to molecular dynamics simulations. The resulting trajectories were analyzed on the basis of substrate accessibility to the catalytic site by preliminary docking calculations on a model substrate, 4-HP6. At the end of this process, one of the models was selected for further analysis. Third, detailed substrate docking in the wild type enzyme was performed. Representative enzyme conformations were extracted using a receptor-based scoring function designed to recognize catalytic site

conformations likely to be compatible with catalysis. Finally, mutations were rationally designed on the basis of *in silico* results and experimentally tested by *in vivo* assays.

Template selection and target-template alignments. The search for proteins of known structures presenting sequence homology with Coq6p consistently identified FAD-dependent monooxygenases. Such proteins constitute appropriate templates for homology modeling and their crystal structures are identified as follows in the PDB database: 4N9X,[24] 4K22,[23] 2X3N,[27] and 1PBE.[40] Sequence alignment of coq6p with these templates identifies low identities (28.32%, 27.30%, 20.30%, 18.51%, respectively, see **Fig. S2**).

In spite of regions with unsolved coordinates in several of the templates, these templates exhibit similar overall tertiary structures with a Rossmann-like $\beta/\alpha/\beta$ fold forming an FAD-binding domain and a large beta sheet forming a substrate binding domain. Structural comparison shows that the core secondary structure elements are overlapping (**Fig. S3**).

If one assumes that such structural features also translate to Coq6p and that they are correlated to Coq6p function, then an approach based on homology modeling is relevant. In order to resolve alignment ambiguities among these low homology sequences, the pairwise alignments of Coq6p with 4K22,[23] 4N9X,[24]⁶⁴ 2X3N,[27] and 1PBE[40] were manually curated by cross-referencing them against a multiple sequence alignment of more than 119 Coq6 homologues (HTML/PDF provided in SI, Fig.S4) as well as by considering the 3D structure of each template. The resulting target-template pairwise alignments were then collated to build a structurally annotated alignment for Coq6p shown in Fig. 2. Compared to the templates, it is apparent that Coq6p contains a long additional sequence designated Coq6 insert (293-343), with the insert of Coq6p S. *cerevisiae* being one of the longest in the Coq6 family (Fig.S4). Target-template alignments for each of the three modeling protocols are presented in Fig. S5. ROBETTA and I-TASSER automatically chose a single template each, 1PBE[40] and 2X3N[27] respectively. Based on structure-function assumptions, the alignment passed to MODELLER combined 3 templates: 2X3N[27] for most of Coq6p N-terminal region (1-426), 4N9X[24] for the C-terminal region not present in 2X3N (427-479), and 4K22[23] for a small 6-residue segment of the beta-sheet domain (352-357).

Figure 2. Sequence alignment of Coq6p with templates used by the different homology modeling approaches. The structural annotations are derived from studies of pHBH, the holotype for this class of enzymes. The templates are referred to by their PDB codes. 2X3N[27] is a putative quinolone monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* (1.75 Å resolution); 4N9X, [24] a putative ubiquinone biosynthesis monooxygenase from *Erwinia carotovora* (2.5 Å resolution); 4K22,[23] a ubiquinone biosynthesis hydroxylase from *E. coli* (2 Å resolution); 1PBE,[40] the para-

hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*. Secondary structure as calculated by DSSP is indicated by text color: beta strands are blue, alpha helices are red, and turns are in black. Residues missing from crystal structures have background highlighted in red. Residues selected for building the active-site geometric descriptor and scoring function are highlighted in yellow. FAD binding residues are highlighted in green.

Homology models. Fig. 3 highlights structural differences between the three homology models, Coq6p I-TASSER, Coq6 ROBETTA and the manually curated Coq6p MODELLER model, prior to MD. It is interesting that in all monooxygenase structures from the PDB that are bound to FAD , the Rossman fold is always constituted of a loop structured as a α -helix, suggesting that a catalytically competent Coq6p may have its FAD binding-loop in a α -helix as well. All three models are derived from templates with an GDAxH loop compatible with FAD binding (see comments in SI), with the *si* loop (for which the templates are incompletely resolved) consistently reconstructed as a helix. Two major structural elements discriminate the models: the C-terminus and the 51residue Coq6p-family insert. The former arguably strongly depends on template choice, with ROBETTA and the manually-generated models resorting to 1PBE[40] and 4N9X[24] respectively, while I-TASSER does not rely on any template in this region, since it is not present in 2X3N.[27] The insert is not present in any of the templates; therefore its final conformation in the models solely results from methodological differences for modeling *ab initio* regions. It is however consistently predicted to have a helix-turn-helix tertiary structure. The insert is systematically localized to the exterior face of the beta-sheet domain, with no residues proximal to the active site. Since all flavindependent monooxygenases with known structure show catalytic activity without a similar structural element, the Coq6p insert is unlikely to be required for catalysis. However, its conservation among the Coq6 family (Fig. S4) and its high proportion of polar and charged residues suggest that it may be essential for integration of this enzyme into the obligate CoQ biosynthesis complex through ionic protein-protein interactions.

Figure 3. Comparison of the three Coq6 p homology models. The Coq6p enzyme secondary structure is shown in cartoon, while the FAD cofactor is shown in green stick. Structurally divergent Coq6p secondary structure elements are highlighted in orange (the C-terminus) and purple (the Coq6-family insert). From left to right: Coq6_I-TASSER model, Coq6_ROBETTA model, and the manually curated Coq6_MODELLER model. The top row shows the models from the re-face, while the bottom row is rotated 90 degrees about the vertical to show the exterior of the beta sheet domain, which bears the insert.
Molecular dynamics analysis. All three Coq6p-FAD homology models were subjected to the same molecular dynamics (MD) protocol. The aim of this process is first to investigate the structural stability of the models and perform conformational sampling of each model, which is important for subsequent substrate docking. All models appeared structurally-stable through MD, all having converged to a conformational plateau in which RMSD fluctuations are as expected for proteins of this size simulated in physiological conditions (Fig. S6), all having stable secondary structures (Figs. S7-S9). This suggests that approximations and assumptions made during the modeling process (related to *e.g.* the *ab initio* modeling procedure for sections with no reference structural data, or the manual addition of FAD post Coq6p model generation) did not prevent any of the models to be close enough to a low-energy state. The conformations of the three Coq6p models after 20 ns MD are illustrated in Fig. S10. It is noted that the regions identified as most important for Coq6p function, such as the FAD-binding domain helices and the β -sheet domain, appear more stable structurally than the rest of the protein and especially the Coq6p insert and Cterminal region (as observed from their RMSDs in Fig. S6). The FAD binding mode as exemplified in Fig.4 was stable in the three homology models over the course of MD calculations.

Figure 4. Model of FAD bound to Coq6p, as shown in the manually curated Coq6_MODELLER model. This pose is from a FAD binding conformation selected from MD simulations (C: black, N: blue,O: red, P: orange). Hydrogen bonds are in green dashed lines, and π -type interactions with FAD's cycles in purple dashed lines (centre of mass are materialized with clear blue spheres). Residues are in sticks (C: green, S: yellow, O: red, N: blue). The adenine ring's N3 nitrogen is H-bonded to V167. The adenine aromatic system can also form π -sulfur interactions with M62 and π -anion interactions with D201. The ribose hydroxyl is H-bonded to D61. The pyrophosphate is H-bonded to the side chains of R83 and N204, as well as the backbone nitrogen of F203 (side chain omitted for clarity). The ribityl chain is H-bonded to the side-chain of D374, the D of the GDAxH motif. The isoalloxazine ring can form $\pi - \pi$ interactions with the F354 side chain (backbone omitted for clarity). These residues are highly conserved in the Coq6 family (FigS4; highlighted in green in Fig. 2), with the exception of M62 and F203.

Catalytic site identification. As strongly suggested by the position of FAD in both 1PBE[40] and Coq6p models, the most-plausible location of the Coq6p catalytic site is a buried volume immediately facing the isoalloxazine ring, about 14 Å away from the protein surface. Focusing on this specific region (**Fig. 5**), key residues were identified in both the 1PBE crystal structure, in which they contact the substrate 4-HB (S212, R214, P293 and T294, **Fig. 5A**), and in Coq6p (T261, M255,

P381 and L382, **Fig. 5B**). These residues were used to build the receptor-based scoring-function with the exception of M255 to identify catalytically competent poses. Three of these residues (T261, P381 and L382) are very conserved among Coq6 eukaryotic sequences (**Fig. S4**). They provide the same arrangement of 1 H-bond donor (PHBH: S212/Oγ; Coq6p: T261/Oγ) and 2 H-bond acceptors (P293,T294/O; P381-L382/O). Coq6p M255 cannot provide similar interactions to pHBH R214 (H-bonding to the 4-HB carboxyl group) although it is located at the same position, and hence was not included in the scoring-function. The 4-HB position in pHBH also gives us a diagnostic distance (4.32 Å) between the C4X FAD-atom which bears the peroxo group of the reactive FAD-OOH intermediate and the substrate target carbon to be hydroxylated.[40] The FAD C4X atom position in Coq6p relative to T261, P381 and L382 is also well predicted when compared to that in 1PBE (**Fig. 5B**).

Figure 5. Comparison of pHBH's active site crystal structure with the same region in the **Coq6p model** (here, the manually-curated Coq6p_MODELLER model). The active site interatomic distances used for the scoring function-based substrate docking are shown as blue lines (see Methods). A): The co-crystal structure of para-hydroxybenzoate in pHBH provides coordinates of a structurally and functionally homologous enzyme-substrate-co-factor complex.[40] In order to capture the active-site geometry compatible with substrate binding, a receptor-based geometric descriptor is derived from the enzyme's hydrogen bonding partners with the substrate. B): Residues and atoms used in the geometric descriptor derived for pHBH are mapped onto homologous residues and atoms in the Coq6p catalytic site.

As preliminary investigations, the active site in pHBH was investigated using MD simulations starting from the crystal structure of the pHBH-FAD complex from 1PBE[40] with the substrate removed. The arrangement of the identified key residues selected above could be reccurrently found through the 20 ns MD, using the receptor-based scoring-function. When re-docking 4-HB in the pHBH-FAD *substrate free* complex,[⁶⁵] the calculations reproduced the crystal pose of 4-HB in 1PBE. Translated to Coq6p, these calculations imply that enzyme conformations that are able to bind the substrate directly can be found by exploring *subtrate free* conformational space through MD.

In silico identification of a substrate access channel in yCoq6. The three Coq6p models were then assessed for the presence of cavities for substrate binding and access to the catalytic site by computation of accessible void regions. Three distinct tunnels connecting Coq6p surface to the putative catalytic site were identified on the pre-MD homology models (**Fig. 6**). Two of these

tunnels (1 and 2, in purple and blue, respectively) exit the enzyme from the *re*-face, the other (3, in red) from the *si*-face of the isoalloxazine ring.

Figure 6. Volume rendering of the channels system identified in the resting model Coq6p enzymes, Coq6p_I-TASSER model (A), Coq6p_ROBETTA model (B) and manually curated Coq6p_MODELLER model (C). Three channels are identified that converge on the catalytic site close to the FAD binding site (in green stick). Bottleneck residues used in MD channel diameter tracking are represented as sticks.

Assuming that substrate binding does not involve significant induced fit effects, it should traverse at least one of the three channels. For each of these, a pair of residues corresponding to the bottlenecks was identified, and the corresponding distance monitored through the MD simulations (**Fig. S11**). MD snapshots were extracted according to the maximal values of this bottleneck distance and served as targets for automated substrate docking, using 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol (4-HP6) as a Q₆ model substrate.

The choice of the model substrate as 4-HP6 was motivated as follows. Cells lacking an active Coq6 enzyme accumulate 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol (4-HP6).[17] 3-hexaprenyl-4-hydroxybenzoate (4-HB6) has also been proposed to be the substrate of Coq6 on the basis that the decarboxylation reaction of the eukaryotic Q biosynthesis pathway could occur after the C5-hydroxylation step catalyzed by Coq6.[⁶⁶] Yet clear experimental evidence are missing to strongly support either 4-HB6 or 4-HP6 as substrate of Coq6 since no *in vitro* assay is available and the decarboxylase enzyme is not identified.[13] In pHBH,[40] the carboxyl group of the substrate 4-hydroxybenzoate is hydrogen bonded with R214 in the active site, but Coq6p lacks such residue (**Fig. 5B**). Furthermore, preliminary docking studies revealed that 4-HP6 adopts more coherent poses in the catalytic site of Coq6p compared to 4-HB6. We therefore chose to continue our investigation of substrate docking with 4-HP6.

It was then found that only a specific tunnel in a specific model (the *re*-face tunnel 1 in the manually curated Coq6p_MODELLER model, **Fig. 6C**, purple volume) produced plausible binding modes of 4-HP6, i.e. with the substrate aromatic head placed in the cavity of the putative catalytic site (**Fig. 7**). Using the receptor-based scoring function, MD conformations from this model were further selected so as to resemble the 1PBE enzyme substrate-bound conformation as much as possible (see Methods). In a second round of calculations, the substrate was docked into these Coq6p conformations. This resulted in a systematic convergence to a single binding mode with the aromatic head close to the FAD cofactor and the hydroxyls oriented as to bind the two following residues (**Fig. 7**): the H-bond donor, T261, and the H-bond acceptor, P381, a highly conserved

residue among Coq6ps (**Fig. S4**). The distance between the substrate C5 atom and FAD C4X atom is consistently is found at 4.7 Å (**Fig. 7**), very similar to the corresponding 4.32 Å FAD-4-HB distance in the pHBH-FAD-4-HB complex from 1PBE. [40] The isoprenyl chain can adopt a variety of conformations traversing the channel and reaching the surface, and exhibits a number of contact with hybrophobic residues such as P249, L253, L382, L438 and F439. Overall, these sequential series of calculations allowed us to identify the *re*-face tunnel 1 as the putative substrate access channel in Coq6p.

Figure 7. Recurrent catalytically competent poses of the 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol model substrate in the re-face tunnel 1 of the Coq6p_MODELLER model. The enzyme conformation for the substrate docking calculations was selected with the active site geometric descriptor scoring-function derived from 1PBE[40] (see Methods). The FAD co-factor is represented in green stick and the substrate in grey (aromatic head) and blue (isoprenyl chain). Several substrate poses are superimposed within the accessible volume (transparent pink) delimited by the re-face substrate access tunnel 1. The substrate's C1 and C6 hydroxyl groups can form hydrogen bonds (green dashed lines) with the backbone oxygen of P381 and the side chain oxygen of T261. One pose is also illustrated that shows a distance between the substrate's C5 carbon (the hydroxylation target) and the FAD's C4X (which bears the reactive peroxo group) of 4.7Å (dashed orange line), similar to the homologous distance observed in the 1PBE structure of 4.3Å.

Evolutionary conservation of residues lining the tunnel system of Coq6p was determined by submitting the Coq6p sequence to the ConSurf server and mapping the residue conservation scores onto the Coq6p homology model (**Fig. 8A**). Interestingly, it identified the *re*-face tunnel 1 leading to the active site as the most conserved tunnel. Furthermore, the walls of tunnel 1 are lined almost exclusively with hydrophobic and uncharged side chains, F244, P249, S265, P381, L382 and F439, (**Fig. 8B**), which is appropriate for the channeling of the isoprenyl chain. For comparison, the 4N9X experimental structure[24] (an Ubil homologue) was also submitted to establish a map of residue conservation, which pointed to a similarly conserved *re*-face tunnel. All together, these results suggest that the hydrophobic character of this tunnel is conserved.

Figure 8. A) Evolutionary residue conservation in Coq6p as calculated by the ConSurf method [30,31] and projected onto the manual Coq6p homology model, space-filling rendering. The conservation scores can identify the FAD binding site (not visible in this view). B) Residue conservation scores also identify a group of conserved residues along the re-face tunnel 1 (represented in magenta) reaching the surface and forming a depression (delineated by a black circle in panel A). This surface depression leads to a void volume contiguous with the catalytic site,

and is lined with highly conserved residues represented in magenta sticks. For clarity, only the residues present at the tunnel entrance are shown. This set of residues is generally hydrophobic, with rare exception, such as S265. The polar residues may participate in contacting the substrate's aromatic head as it traverses the channel to the catalytic site. FAD is represented in green stick.

In silico mutagenesis. Several deleterious mutations in human Coq6, hCoq6, were recently reported, including R162X, G255R, A353D and W447X,[20] D208H[⁶⁷] and Y412C.[59] Aligning the hCoq6 sequence with our manually curated alignment, corresponding Coq6p residues were identified and mapped onto the homology model (Fig. S12). Interestingly, the hCoq6 G255R mutation translates to a G248R mutation in Coq6p, and is positioned at the entrance of the putative re-face substrate access tunnel 1 identified above, with the arginine sidechain pointing towards the channel lumen (Fig. 9C). MD trajectories of the Coq6p-G248R mutant showed a significant reduction of the channel diameter at the choke point (Fig. 9A, red line) with respect to the wild type (Fig. 9A, blue line). The R248 sidechain samples blocking and non-blocking conformations, consistent with the reported reduced activity of the corresponding human mutated enzyme.^{[20,}59] We also identified L382 (Fig. 9B), a highly conserved residue which faces G248 across the channel, as a key site to introduce another mutation to block this channel. The L382 sidechain is oriented towards the lumen of the access channel and could be mutated to a larger sidechain. Its solvent exposure also suggests that mutation to a polar or charged residue may be possible. We reasoned that a mutation to glutamate, L382E, would be tolerated by the structure while allowing the formation of a salt bridge with the G248R sidechain (Fig. 9E). MD calculations of the single Coq6p-L382E mutant (Fig. 9A, green line, and Fig. 9D) showed a significant decrease of the channel diameter when compared to the wild type. However, traversable conformations were occasionally observed during MD runs, allowing us to dock the model substrate. Turning to the Coq6p-G248R-L382E double mutant, MD calculations predicted the formation of a stable salt bridge spanning the channel lumen and causing a complete and persistent blocking of the channel over the 20 ns trajectory (Fig. 9A, purple line). Overall, these results show that single mutations partially block the channel, whereas the double mutation causes a complete blockage.

Figure 9. Molecular dynamics of Coq6p homology models. A): Time-evolution of substrate access channel diameter at choke points over MD runs for Coq6p_MODELLER homology model: wild-type (blue trace), Coq6p-G248R (red trace) and Coq6p-L382E (green trace) single mutants, and the Coq6p-G248R-L382E double mutant (purple trace). B): In the wild-type, the channel diameter is large and is constitutively open. C-D): The single mutants display consistently reduced channel diameters which show thermal fluctuations around open and closed states. E): The double

mutant displays a channel diameter that is always below the minimum required for substrate binding. In this figure, re face tunnel 1 (purple volume) is oriented directly to the viewer. The pair of residues tracked of the MD calculations as bottlenecks of the channel are represented in sticks.

In vivo mutagenesis results. To corroborate our in silico predictions, site-directed mutagenesis was performed to test the role of the G248 and L382 residues by studying the single mutants G248R and L382E, as well as the double mutant G248R-L382E. The effect of these different mutations on Coq6p activity was tested in vivo. Contrary to growth on the fermentable glucose medium, growth on the respiratory medium containing lactate-glycerol (LG) requires a functional respiratory chain and is thus dependent on ubiquinone. Accordingly, the Δcoq6 strain is unable to grow on LG medium unless it is complemented with a plasmid expressing Coq6p (Fig. 10A). The growth provided by Coq6p-L382E was comparable to that of Coq6p, but Coq6p-G248R was slightly compromised (Fig. 10A). The Δ coq6 strain expressing Coq6p-G248R-L382E was unable to grow on LG medium showing that the L382E and G248R mutations have an additive effect. Addition of vanillic acid (VA) to the growth medium is able to restore Q₆ biosynthesis in Coq6deficient cells by bypassing the deficient C5-hydroxylation reaction, provided that the Q biosynthetic complex is stable which requires a stable Coq6p polypeptide.[17] Non-empty vectors expressing any of the three Coq6p mutant proteins allowed growth on LG medium + VA (Fig. 10A), supporting that the Coq6p-G248R-L382E is stable. HPLC-ECD analysis of the Q content correlated with the growth phenotypes and showed that Q was undetectable in cells expressing Coq6p-G248R-L382E (Fig. 10B). These cells accumulated 4-HP6 which is characteristic of a C5hydroxylation defect but forms only when the CoQ synthome is assembled, supporting again that Coq6p-G248R-L382E accumulates in vivo as a stable polypeptide. The Q levels measured in cells expressing Coq6p-G248R and Coq6p-L382E were intermediate (Fig. 10B/C). Altogether, these results show that the G248R and L382E mutations decrease Coq6p activity to some extent while the combination of both mutations completely inactivates the protein without affecting its stability. These data are consistent with the theoretical prediction of the substrate channel being blocked by the proposed interaction between R248 and E382 residues.

Figure 10. A) 10 fold serial dilution of the Δcoq6 strain carrying an empty plasmid (vec) or plasmids coding for yCoq6, yCoq6-G248R, yCoq6-L382E and yCoq6-G248R-L382E. The plates contained YNB-pABA agar medium supplemented with the indicated carbon source and vanillic acid (VA) or not. The plates were imaged after incubation at 30°C for 2 days (glucose) or 6 days (lactate-glycerol). B) Representative electrochromatogram of lipid extracts from Δcoq6 cells expressing either yCoq6, yCoq6-G248R, yCoq6-L382E and yCoq6-G248R-L382E (1 mg of cells). The

elution position of the Q₄ standard, of 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol (4-HP6) and Q₆ are indicated. C) Q6 amounts (in pmoles per mg of wet weight) in Δ coq6 cells expressing either yCoq6, yCoq6-G248R, yCoq6-L382E or yCoq6-G248R-L382E. Cells were grown in YNB–pABA 2% lactate-glycerol containing 10 μ M 4HB. The results are the average of 3-4 independent experiments and error bars represent standard deviation. ND, not detected.

Discussion and Concluding remarks

Biochemical results provide evidence that Coq6p is a flavoprotein, using FAD as a co-factor. A sequential computational strategy was then adopted comprising the construction of homology models of Coq6p, followed by MD calculations of the FAD-Coq6p complexes. We used these models to get insight into the catalytic site structure and a tunnel system in Coq6p. A specific tunnel was identified and experimentally substantiated through *in vivo* studies of selected mutants.

One important limitation of homology modeling is the availability of templates with sufficiently high sequence identities. While operating in a regime of low sequence identity, the sequence-based searched templates used for Coq6p homology models (i.e. 4N9X,[24] 4K22,[23] 2X3N,[27] and 1PBE,[40]) share the same Rossmann-fold of monooxygenase structures, belonging to the class A of flavoproteins.[⁶⁸,⁶⁹] Importantly, all three FAD-Coq6p homology models display well-formed α -helix loops as part of the highly conserved GDAxH motif (highlighted in orange in **Fig. S3**), directly inherited from their respective template in that region. Through MD calculations, FAD in complex with Coq6p recapitulates a number of canonical enzyme-cofactor contacts (**Fig. 4**). When compared to 2X3N,[27] a FAD-cocrystallized structure, the ribityl chain is H-bonded to the side-chain of D374, (D292 in 2X3N) and the ribose is H-bonded to the side-chain of D61, (Q35 in 2X3N). Also, the negatively charged pyrophosphate group is electrostatically complemented by the α 1 helix dipole of the $\beta/\alpha/\beta$ fold at the N-terminus as in 2X3N.

Turning to structure-function, studies of pHBH's catalytic cycle indicate that the substrate enters the active site through a channel, the active site being shielded from solvent.⁷⁰ We reasoned that the physical pathway of the aromatic head entry and isoprenyl tail binding is likely to be also a tunnel traversing the Coq6p protein. Calculations on the resting Coq6p models (prior MD) show that they share a general multiple channel system, with three distinct tunnels converging to the highly conserved active site (**Fig. 7**), a buried volume immediately facing FAD.

The traversability of Coq6p channel system by the substrate was assessed computationally. Here, we postulate a conformational pre-selection mechanism (as opposed to induced-fit) whereby conformations of Coq6p compatible with substrate binding might be accessible through MD calculations on the substrate-free enzyme.⁷¹] The key outcome of these calculations is that *re*face tunnel 1 may be the Coq6p access channel for its substrate (**Fig. 6-8**). Interestingly, this channel turned out the most conserved one and furthermore it is lined with hydrophobic residues appropriate for contact with the isoprenyl tail of the substrate.

This drove us to perform *in silico* mutagenesis at its entrance and propose single and double-mutations to potentially hinder substrate binding. The experimental *in vivo* findings, ie the reduced Q6 biosynthesis of the single and double mutants, provide *a posteriori* validation of our *in silico* mutagenesis, and overall of the computational strategy including our conformational preselection hypothesis.

This work provides the first detailed structural information of an important and highly conserved enzyme of ubiquinone biosynthesis in the absence of crystallographic data. First, it demonstrates that Coq6p is a FAD enzyme and thus belongs to the FAD-dependent mono-oxygenase family. Second, in order to accommodate a bulky hydrophobic substrate, it has evolved a channel and a cavity to specifically direct the substrate towards the catalytic site. Future work should address the catalytic activity of Coq6p since so far we and others failed to find the proper conditions for detecting *in vitro* enzyme activity. This is not surprising considering the difficulty related to the synthesis of the substrate (highly hydrophobic), to the complexity of the redox system associated to Coq6p activity [16] and the likely requirement for protein partners within CoQ synthome.[12] The availability of a structural model for Coq6p makes it possible to consider further computational approaches regarding its integration in more complex interactions with other proteins and with the membrane. As examplified here, *in silico* mutagenesis studies can be coupled to *in vivo* confirmation to explore functional hypothesis.

Acknowledgments

We acknowledge support from Fondation de l'Orangerie for individual Philanthropy and its donors. This work was supported by the French State Program 'Investissements d'Avenir' (Grant 'LABEX DYNAMO, ANR-11-LABX-0011). We thank Dr. Cathy Clarke (UCLA) for the Δcoq6 strain and Dr. Leonardo Salviati (University of Padova) for the plasmids encoding Coq6 and Coq6-G248R.

Author contribution

Simulations: AI, VL, CMD. Experiments: MS, LG, ML, FP. Wrote the paper: AI, VL, ML, FP, CMD, MF.

Supporting Information

Table S1: Oligonucleotides used in the present study.

Fig. S1. Optimized DNA sequence of the coq6 gene from *Saccharomyces cerevisiae* and its translation in amino-acids.

Fig. S2. Sequence alignment of Coq6p with 2X3N, 4N9X, 4K22 and 1PBE complete sequences.

Fig. S3. Structural comparison of the four structural templates used in this work, 2X3N, 4K22, 4N9X, and 1PBE.

Fig. S4. Alignment as extracted from the Multiple Sequence Alignment of Coq6p with 119 homologues as calculated by ConSurf.

Fig. S5. Alignments used for the generation of the Coq6p homology models.

Fig. S6. Time evolution over MD calculations of regional RMSDs for selected structural elements of Coq6p models.

Fig. S7. Secondary structure timeline analysis as computed by the timeline plugin contained in VMD for the Coq6p_I-TASSER model.

Fig. S8. Secondary structure timeline analysis as computed by the timeline plugin contained in VMD for the manually curated Coq6p_ MODELLER model.

Fig. S9. Secondary structure timeline analysis as computed by the timeline plugin contained in VMD for the Coq6p_ROBETTA model.

Fig. S10. Comparison of conformations of the three Coq6p models before and after 20 ns MD.

Fig. S11. MD time-evolution in nanosecondes of the selected interatomic distances at choke points of tunnels 1, 2 and 3 in the three Coq6p models.

Fig. S12. Schematic ribon representation of Coq6p with the positions of mutated residues reported in literature for hCoq6.

Figures



Figure 1

Annexe

	25	22	12	5.2	(2)	72	0.2	0.2	101
Contra	25	JJ	43	53	63	13	83	93	101
codob		VGGGPAGLIL	AASIKNSPUL	KDEKTTEVDM	VDEKDKESDE	INSPEDIEIN	RIVSVIPRSI	HE PENNAG	ALEMADRIQS
2V3N	MPDNILTDUT T	NCCCTCCAM	AVIICA	OCHPUNNEO	ADDEDAT	N	CADLENDACT	DWVEA-ACTT	AFUTDDCCDU
AN9X	MOSEDVVT	AGGGMVGLAL	ACGLOG	SGLETAVIEK	OAAEPOTLCK	GHAI.	RUSATNAASE	CLLRH-IGVW	ENLVAORVSP
4822	MOSVDVAT	VGGGMVGLAV	ACGLOG	SCLEVAVIEO	RVOEPLAANA	PPOI.	RUSATNAASE	KLLTR-LCVW	ODTLSPRASC
1PBE	MKTOVAT	IGAGPSGLLL	GOLLHKA	GIDNVILER	OTPDYVLGR-	T	RAGVIEOGMV	DLLRE-AGV-	DRRMARDGLV
cons.	MTXXXXDVXI	XGGGXXGLXL	AXXLXXXPOL	XGLEXXVIEX	XXXEXXXXXX	XXXPPXYFTX	RXXXXXXASX	XLLXXNAGVW	XXXXXRRXXX
cono.	FAI) binding motif	1	TODIUTIT	siloo	n			
		s ontoing motin.	•	1212120	51100				
	111	121	129	133	143	153	163	173	183
Coq6p	YDGLYVTDGC	SKATLDLA	-RDSM	LCMIEIINIQ	ASLYNRISQY	DSKKDSIDII	DNTKVVNIKH	SDPNDPLSWP	LVTLSNG
2V2M	PHETEVYUDC	FITDYEN	VECUDADCY	FTIMPCECTD	DIVIENTOCE	ATTICAT	FETDIENUOD	DEDUA	OUDIN
ANOV	KHELEVINDG	-ELLKIPN	-ISSVDARGI	FILMPCESER	KLVLEKIDGE	AIVEML	LEDWELKOUN	DERHAID	QVKLNDG
4197	VHCMEVWDKD	-SFGRISE	-DDOSMCVSH	LCHTVENSVI	ACAT MAKARO	SSDITL	LAPAFLOOVA	WCENETE	
1 PRE	HEGVETAFAC	OPPRIDLERL	SCCKT	VTVVCOTEVT	PDIMEAPEAC	GATTV	VODAEVELHD	LOCEPP	VUTEERDCER
cons	VYCYEVYDYY	VYYYYYYYYII.	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	LYXTXXXXXXX	XXXI.XXXXXXX	VSKKYSYYTI.	VYYYYYYYYY	YXXNYYFYYD	XVXXXPDCXX
cons.	INGALIVADAA	AAAAAAAAA	ΛΛΛΛΛΛΟΛΟΛ	DAATAAAAYA	AAAuaaaaa	ADATADAATD	000000000000000000000000000000000000000	AAAMAALAAL	AVAAADOAA
	190	199	209	216	226	236	246	255	264
Coq6p	EVYKTRLLV-	GADGENSPTR	RFSQIPS	RGWMYNAYGV	VASMKLEYPP	FKLRGWQRFL	PTGPIAHL-P	MPENN-ATLV	WSSSERLSRL
2X3N	RVLRPRVVV-	GADGIASYVR	RRLLDIDV	ERRPYPSPML	VGTFAL-APC	VAERNRLYVD	SQGGLAYFYP	IGFDR-ARLV	VSFPREEARE
4N9X	DSMLTARLVV	GADGAHSWLR	QHADIPL	TFWDYGHHAL	VANIRTEHPH	QSVARQAFHG	-DGILAFL-P	LDDPHLCSIV	WSLSPEQALV
4K22	GSMLTARLV1	GADGANSWLR	NKADIPL	TEWDYQHHAL	VATIRTEEPH	DAVARQVFHG	-EGILAFL-P	LSDPHLCSIV	WSLSPEEAQR
1PBE	LRLDCDYIA-	GCDGFHGISR	QSIPAERLKV	FERVYPFGWL	GLLADTPPVS	HELIYANH	PRGFALCS-Q	RSATR-SRYY	VQVPLTEKVE
cons.	XXXXTXXLVX	GADGXXSXXR	XXXXAEXXXX	XXWXYXXXXL	VAXXXTEXPX	XXXXXXXXXXX	PXGXLAXLYP	XXXXXXXXXXX	WSXSXEEAXX
						0000	hla substrata a	rease tunnal	
						poss	iole substrate a	Less tunner	
	274	283	293	303	313	323	333	343	353
Coq6p	274 LLSLPP-ESF	283 TALINAAFVL	293 EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT	323 EEIYATLKDE	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA	353 R <mark>F</mark> PLKLTHAD
Coq6p	274 LLSLPP-ESF	283 TALINAAFVL	293 EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT	323 EEIYATLKDE	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA	353 R <mark>F</mark> PLKLTHAD
Coq6p 2X3N	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG	293 EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT	323 EEIYATLKDE AEAIAA	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK	353 R <mark>F</mark> PLKLTHAD GIPIGYLNLD
Coq6p 2X3N 4N9X	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM	293 EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT	323 EEIYATLKDE	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN	293 EDADMNYYYR 	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT DES RLG	323 EEIYATLKDE AEAIAA	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ	353 RFPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN WTELKARL	293 EDADMNYYYR 	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT DES RLG	323 EEIYATLKDE AEAIAA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK	343 VVSIIDKTRA - VTGTSRFK - LCELESERQ - LCKVESARQ LVTGPSLEKS	353 RFPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MOSLPVEEFN MOQASEDEFN DWSDERF XXSXXXEXX	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN WTELKARL RXXXXXXFXX	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX	323 EEIYATLKDE AEAIAA XEXXAXLKDE	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK LCELESERQ - LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN WTELKARL RXXXXXFXX	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins	323 EEIYATLKDE AEAIAA XEXXAXLKDE ert	333 SDIDEIYPPR	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXEXX	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXFXX	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393	313 KLIEDIKFRT RLG 	AEAIAA XEXXAXLKDE ert	333 SDIDEIYPPR 	343 VSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXFXX 373 GDAAHTTHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGOGLNMGOT	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE	313 KLIEDIKFRT 	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413	333 SDIDEIYPPR 	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -CELESERQ -CKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXEXX 363 RYCTDRVALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAAHTTHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK - LCELESERQ - LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY	353 REPLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-ĀFDM RALNI-AFDN WTELKARL RXXXXXFXX 373 GDAAHTTHPL GDAIHNVHPI	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGOGMNLATE	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT 	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYOA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNOAIV	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -CELESERQ -CKVESARQ L/TGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL	353 GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRORFA
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAHTIHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGOGVNLGFM	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHSLVYALE DASALADALD DVAELIAELK	313 KLIEDIKFRT 	323 EEIYATLKDE AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA OHLYLRRYER	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMOGFRELF	353 GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTHPL GDAHTHPL GDAAHTHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM	303 TLEDGSMDTD	313 KLIEDIKFRT 	AEAIAA XEXXAXLKDE 413 SSLSLEPFWA QHLYLRRYER QYIYLRRYER	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ LCEVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF	353 GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALÑI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM GAKGLNLAAS	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAĀELIAELK DVSTLYRLLL	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE-	AEAIAA XEXXAXLKDE 413 SSLSLEPFWA QHLYLRRYER QYIYLRRYER LLERYSA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAALML ICLRRIWKAE	343 V/SIIDKTRA - VTGTSRFK - LCELESERQ - LCKVESARQ LYTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SIGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWMTSVL	353 GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXRLALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTYPPT GDAAHTXHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM GAKGLNLASS AGQGVNLGXX	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVH3LVYALE DASALADALD DVAELIAELK DVAELIAELK DVSFLYRLLL DVXKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT 	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA PHLYLRYER QYTYLRYER QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXXL	343 VVSIIDKTRA - VTGTSRFK - LCELESERQ - LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXXXXXXXXXXX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWMTSVL XXXXXXXXXX	353 R PLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALÑI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTHPL GDAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTIPL GDAAHTVPPT GDAAHTXHPL FAD bir	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM GAKGLNLAAS AGQGXNLGXX	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAAELIAELK DVSFLYRLLL DVSKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA QHLYLRRYER QYTYLRRYER QXXXLXRYXA	333 SDIDE IYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRR IWKAE XRXXSXXXL	343 V/SIIDKTRA - VTGTSRFK - LCELESER LCELESER LTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRDLF RFSWMTSVL XXXXXXXXX	353 R PLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK MRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXRLALV	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTIHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGXNLGXX ding motif 2	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHSLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DVAELIAELK DVSTLYRLLL DVXLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER QYIYLRRYER QXXXLXRYXA	333 SDIDE IYPPR PAEVAEK SDIXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RKKHSAAVML SRKHSAAIML ICLRR IWKAE XRXXSXXXL	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK - LCELESERQ - LCEVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRELF RFSWWMTSVL XXXXXXXXXX	353 GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV 450	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTIPL GDAAHTHPL GDAAHTYPPT FAD bir 460	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR EDADMNYYR SAGQCLNMGQT TGQGNLAIE AGQCVNLGFM AGQCVNLGFM GAKGLNLAS AGQCVNLGFX Iding motif 2	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVH3LVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAAELIAELK DVSFLYRLLL DVXKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA QHLYLRRYER QYIYLRRYER QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXL C-ter	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK - LCELESER - LCELESER - LCEVESARQ LYTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWMTSVL XXXXXXXLX minus	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV 450 VALRTFGLNL	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTIHPL GDAAHTYPPT GDAAHTXHPL FAD bir 460 TNKIGPVKNM	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR BAGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGVNLGFX ding motif 2 470 IIIDTLGGNEK	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHSLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DASELIAELK DVSFLYRLLL DVXKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA OHLYLRRYER QYIYLRRYER LLERYSA QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXL C-ter	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF RFSWWMTSVL XXXXXXXLX minus	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV 450 VALRTFGLNL GVFDTALOGS	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDN WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAAHTHPL GDAAHTIHPL GDAAHTIHPL GDAAHTVPPT GDAAHTVPPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT GDAAHTVPT	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR BAGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGVNLGFX IIDTLGGNEK RSYQPVRSPA	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHSLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DVSFLYRLLL DVXKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER LLERYSA QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RŘKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXXL C-ter	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF RFSWWMTSVL XXXXXXXXLX minus	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV 450 VALRTFGLNL GVFDTALQGS KLLRDVGLVL	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-AFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTHPL GDAHTIHPL GDAHTIHPL GDAHTYPL FAD bir 460 TNKIGPVKNM SRTPEALGGE ADKLPGIKPT	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR B B B B B B B B B B B B B B B B B B	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVH GLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAAELIAELK DVS FLYRLLL DVXKLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG 	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER QYIYLRRYER LLERYSA QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RKHSAAVML SRKHSAAIML ICLRRIWKAE XRXXSXXXL C-ter	343 VVSIIDKTRA VTGTSRFK LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWWMTSVL XXXXXXXLX	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK HRFPDTDAFS XXXXPTDAXX
Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXRLALV 450 VALRTFGLNL GVFDTALQGS KLLRDVGLVL KLLRDIGLKL	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-ĀFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAHTTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTYPPT GDAAHTXHPL FAD bir 460 TNKIGPVKNM SRTPEALGGE ADKLPGIKPT ADTLPGVKPO	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM AGQGVNLGFM GAKGLNLAAS AGQGXNLGFX 11DTLGGNEK RSYQ <u>P</u> VRSPA LIRQAMGLHD LIRQAMGLND	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAÄELIAELK DVSTLYRLLL DVXXLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER QYIYLRRYER LLERYSA QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXXL C-ter	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -CELESERQ -LCELESERQ LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWWMTSVL XXXXXXXXXX	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK SGTNPAK
Coq6p 2X3N 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE	274 LLSLPP-ESF LMADTRGESL MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXRLALV 450 VALRTFGLNL GVFDTALQGS KLLRDVGLVLL KLLRDIGLKL QRIQUTELEY	283 TALINAAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-ĀFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTHPL GDAAHTYPFT GDAAHTXHPL FAD bir 460 TNKIGPVKNM SRTPEALGGE ADKLPGIKFT ADTLPGVKPQ YLGSEAGLAT	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGXNLGFX 11DTLGGNEK RSYQPVRSPA LVRQAMGLHD LIRQAMGLND IAENYVGLPY	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAAELIAELK DVSTLYRLLL DVXXLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RIG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER QYTYLRRYER QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XXXXXXXXL C-ter	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -CELESERQ -CKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWWMTSVL XXXXXXXLX	353 REPLALTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK SGTNPAK
Coq6p 2X3N 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons. Coq6p 2X3N 4N9X 4K22 1PBE cons.	274 LLSLPP-ESF MQSLPVEEFN MQQASEDEFN DWSDERF XXSXXXXEXX 363 RYCTDRVALV RYWADNVAML SFAAHRLVLV QFASHRLALV PMQHGRLFLA XXXXXRLALV 450 VALRTFGLNL GVFDTALQGS KLLRDVGLVL KLLRDVGLVL KLLRDVGLVL	283 TALINAFVL RRRLQ-RFVG RQVAM-ĀFDM RALNI-AFDM WTELKARL RXXXXXXFXX 373 GDAHTTHPL GDAHTTHPL GDAHTIHPL GDAHTIHPL GDAHTIHPL GDAHTYPT GDAHTYPT GDAHTYPT ADTLPGVKM SRTPEALGGE ADKLPGIKFQ YLGSEAGLAT XXXXXXXXXXXX	293 EDADMNYYYR EDADMNYYYR 383 AGQGLNMGQT TGQGMNLAIE AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGVNLGFM GAKGLNLAS AGQGXNLGFX 11DTLGGNEK RSYQPVRSPA LVRQAMGLND LIRQAMGLND LAENYVGLPY XXXQXXGLXX	303 TLEDGSMDTD TLEDGSMDTD 393 DVHGLVYALE DASALADALD DVAELIAELK DAAELIAELK DVSFLYRLLL DVXXLXXXLX	313 KLIEDIKFRT RLG RLG KLIEDIKXXX Coq6-family ins 403 KAMERGLDIG LALRDACAL- RLQTQGKDIG RLHRQGKDIG KAYREGRGE- XAXRXGXDIG	AEAIAA XEXXAXLKDE ert 413 SSLSLEPFWA -EDALAGYQA QHLYLRRYER QYTYLRRYER LLERYSA QXXXLXRYXA	333 SDIDEIYPPR PAEVAEK SDIXXXXXX 423 ERYPSNNVLL ERFPVNQAIV RRKHSAAVML SRKHSAALML ICLRRIWKAE XRXXSXXXL C-terr	343 V/SIIDKTRA VTGTSRFK -LCELESERQ -LCKVESARQ LVTGPSLEKS XXXXXSXRX 433 GMADKLFKLY SYGHALATSL ASMQGFRELF AGMQGFRDLF RFSWWMTSVL XXXXXXXLX minus	353 R PLKLTHAD GIPIGYLNLD TFPLMGRYAR VFPLTGRYAR IAPLRSFVVE XFPLXXXXAX 443 HTNFPPV EDRQRFA DGDNPAK SGTNPAK SGTNPAK

Figure 2





Figure 5











Figure 10

REFERENCES

- ¹ Bentinger M, Tekle M, Dallner G (2010) Coenzyme Q- biosynthesis and functions. Biochem Biophys Res Commun 396: 74-79.
- ² Nowicka B, Kruk J (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones.
 Biochim Biophys Acta 1797:1587–1605.
- ³ Aussel L, Pierrel F, Loiseau L, Lombard M, Fontecave M, Barras F (2014) Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. Biochim Biophys Acta, Bioenergetics 1837 (7): 1004-1011.
- ⁴ Sevin DC, Sauer U (2014) Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in Escherichia coli. Nat Chem Biol 10: 266–272.
- ⁵ Kawamukai, M (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q₁₀ by yeasts and other organisms. Biotechnol Appl Biochem 53: 217-226.
- ⁶ Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and Function of coenzyme Q. Biochim Biophys Acta Biomembranes 1660: 171–199.
- ⁷ Quinzii CM, Hirano M (2010) Coenzyme Q and mitochondrial disease. Dev Disabil Res Rev 16:183-188.
- ⁸ Hayashi K, Ogiyama Y, Yokomi K, Nakagawa T, Kaino T, Kawamukai M (2014) Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. PLoS One 9: e99038.
- ⁹ Meganathan R (2001) Ubiquinone Biosynthesis in Microorganisms. FEMS Microbiol Lett 203: 131–39.
- ¹⁰ Tran UC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. Mitochondrion 7: S62-71.
- ¹¹ Wang Y, Hekimi S (2013) Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. Crit Rev Biochem Mol Biol 48, 69-88.
- ¹² Allan CM, Awad AM, Johnson JS, Shirasaki DI, Wang C, Blaby-Haas CE et al. (2015) Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 290: 7517-7534.
- ¹³ He CHW, Xie LTX, Allan CM, Tran UC, Clarke CF (2014) Coenzyme Q Supplementation or over-Expression of the Yeast Coq8 Putative Kinase Stabilizes Multi-Subunit Coq Polypeptide Complexes in Yeast Coq Null Mutants. Biochim Biophys Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 1841: 630–644.

- ¹⁴ Marbois B, Gin P, Gulmezian M, Clarke CF (2009) The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for the coenzyme Q biosynthesis, Biochim. Biophys. Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 1791, 69-75.
- ¹⁵ Gin P, Hsu AY, Rothman SC, Jonassen T, Lee PT, Tzagoloff A, Clarke CF (2003) The Saccharomyces Cerevisiae COQ6 Gene Encodes a Mitochondrial Flavin-Dependent Monooxygenase Required for Coenzyme Q Biosynthesis. J Biol Chem 278:2 5308–25316.
- ¹⁶ Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Mulhenhoff U, Ozeir M et al. (2010) Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. Chem Biol 17: 449-459.
- ¹⁷ Ozeir M, Muhlenhoff U, Webert H, Lill R, Fontecave M, Pierrel F. (2011). Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency. Chem Biol 18: 1134-1142.
- ¹⁸ Laredj LN, Licitra F, Puccio HM (2014) The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. Biochimie 100C: 78-87.
- ¹⁹ Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chrétien D, Kadhom N, Edery P, et al. (2000) Quinoneresponsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. Lancet 356: 391–395.
- Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, et al. (2011) COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. J. Clin. Invest. 121: 2013–2024.
- ²¹ Uniprot Consortium (2015) UniProt: A Hub for Protein Information. Nucleic Acids Res 43: D204–12.
- ²² Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc 10 : 845-858. See also : Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat Protoc 4 : 363-371. Available : http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2.
- ²³ Chehade MH, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M et al. (2013) Ubil, a new gene in Escherichia coli coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. J. Biol.Chem. 288: 20085–20092.
- ²⁴ Kuzin A, Chen Y, Lew S, Seetharaman J, Mao L, Xiao R. Crystal Structure of the OCTAPRENYL-METHYL-METHOXY-BENZQ MOLECULE from Erwina carotovora subsp. atroseptica strain SCRI 1043 / ATCC BAA-672, Northeast Structural Genomics Consortium (NESG) Target EwR161. To be published.
- ²⁵ Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Buckhardt K et al. (2002). The Protein Data Bank. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58: 899–907. Available: <u>http://www.rcsb.org/pdb</u>

- ²⁶ Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. Nucl Acids Res 38: W545-W549.
- ²⁷ Oke M, Carter LG, Johnson KA, Liu H, McMahon SA, Yan X et al. (2010) The Scottish Structural Proteomics Facility: targets, methods and outputs. J. Struct Funct Genomics 11: 167-180.
- ²⁸ Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013. http://accelrys.com/products/discovery-studio/.
- ²⁹ Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W et al. (2011) Fast, scalable generation of highquality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7:539. Available: <u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>.
- ³⁰ Landau M, Mayrose I, Rosenberg Y, Glaser F, Martz E, Pupko T et al. (2005) ConSurf 2005: The projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. Nucleic Acids Res 33, W299–W302. Available : http://consurf.tau.ac.il/.
- ³¹ Glaser F, Pupko T, Paz I, Bell RE, Bechor D, Martz E et al. (2003) ConSurf: Identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. Bioinformatics 19:163–164.
- ³² Šali A, Blundell TL (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol,
 234: 779–815. Available : http://salilab.org/modeller/modeller.html
- ³³ Fiser A, Do RKG, Šali A (2000). Modeling of loops in protein structures. Protein Science 9 :1753–1773.
- ³⁴ Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Curr Protoc Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc. Chapter 5: 5.6.1-5.6.30, 2006.
- ³⁵ Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008) The Jpred 3 Secondary Structure Prediction Server. Nucleic Acids Res 36 : W197–201. Available: <u>http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred</u>.
- ³⁶ Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated Protein structure and function prediction. Nat Methods 5: 725-738. See also : Yang JY, Yan RX, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nat Methods 12: 7-8 Available: <u>http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</u>
- ³⁷ Kim DE, Chivian D, Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server.
 Nucleic Acids Res 32 : W526-W531. Available: robetta.bakerlab.org.
- ³⁸ Mullins JG (2012) Structural modelling pipelines in next generation sequencing projects. Adv Protein Chem Struct Biol. 89:117-167.
- ³⁹ Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C (2006) Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins Struct Funct Bioinf 65:712. See also: Lindorff-Larse K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO et al. (2010) Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field. Proteins 78 : 1950–58.

- ⁴⁰ Schreuder HA, Prick PAJ, Wierenga RK, Vriend G, Wilson KS, WGJ Hol et al. (1989) Crystal Structure of the P-Hydroxybenzoate Hydroxylase-Substrate Complex Refined at 1.9 Å Resolution: Analysis of the Enzyme-Substrate and Enzyme-Product Complexes. J Mol Biol 208 : 679-696.
- ⁴¹ Sengupta A, Sasikala WD, Mukherjee A, Hazra P (2012) Comparative Study of Flavins Binding with Human Serum Albumin: A Fluorometric, Thermodynamic, and Molecular Dynamics Approach." ChemPhysChem 13 : 2142–2153. doi:10.1002/cphc.201200044.
- ⁴² Wang JM, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. J Comput Chem 25: 1157-1174.
- ⁴³ Jorgensen WL, Jenson C (1998) Temperature dependence of TIP3P, SPC, and TIP4P water form NPT Monte Carlo simulations: seeking temperatures of maximal density. J Comp Chem 19: 1179-1186.
- ⁴⁴ Ballantyne JS, Moyes CD (1987) The Effects of Salinity Acclimation on the Osmotic Properties of Mitochondria from the Gill of Crassostrea-Virginica. J Exp Biol 133: 449-456.
- ⁴⁵ Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R et al. (2013) GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. Bioinformatics 29 (7): 845–54.
- ⁴⁶ Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC (2005) GROMACS:
 Fast, Flexible, and Free. J Comput Chem 26: 1701–1718.
- ⁴⁷ Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. J Comput Chem 18(12): 1463–1472.
- ⁴⁸ Hess B (2008) P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. J Chem Theory Comput 4(1): 116–22.
- ⁴⁹ Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG (1995) A Smooth Particle Mesh Ewald Method. J Chem Phys 103(19) : 8577–8593.
- ⁵⁰ Páll S, Hess B (2013) A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures. Comput Phys Commun 184, 2641–2650.
- ⁵¹ Bussi G, Zykova-Timan T, Parrinello M (2009). Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling J Chem Phys 130(7):074101.
- ⁵² Parrinello M, Rahman A (1981) Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. J Appl Phys 52 (12): 7182–90.
- ⁵³ Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996). VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph, 14(1), 33–38.

- ⁵⁴ Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, Brezovsky J, Kozlikova B et al. (2012) CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. PloS Comput Biol 8(10): e1002708. Available: http://caver.cz/.
- ⁵⁵ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC. Available: http://www.pymol.org.
- ⁵⁶ Entsch B, Cole LJ, Ballou DP (2005) Protein Dynamics and Electrostatics in the Function of P-Hydroxybenzoate Hydroxylase. Arch Biochem Biophys 433 : 297–311.
- ⁵⁷ Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. J Comput Chem 30 : 2785–2791. Available : http://autodock.scripps.edu/
- ⁵⁸ Trott O, Olson. AJ (2010) AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. J Comput Chem 31: 455– 461. Available: http://vina.scripps.edu/.
- ⁵⁹ Doimo M, Trevisson E, Airik R, Bergdoll M, Santos-Ocana C, Hildebrandt F et al. (2014) Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q deficiency. Biochim Biophys Acta 1842: 1-6.
- ⁶⁰ Gin P, Hsu AY, Rothman SC, Jonassen T, Lee PT, Tzagoloff A et al. (2003) The Saccharomyces cerevisiae COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. J Biol Chem 278: 25308-25316.
- ⁶¹ Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual, CSHL Press, Plainview, NY; 2000.
- Jauch R, Yeo HC, Kolatkar PR, Clarke ND (2007) Assessment of CASP7 Structure Predictions for Template Free Targets. Proteins: Struct Funct Bioinf 69(S8): 57–67.
- ⁶³ Battey JND, Kopp J, Bordoli L, Read RJ, Clarke ND, Schwede T (2007) Automated Server Predictions in CASP7. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 69, no. S8: 68–82.

- ⁶⁵ In this case, the scoring function was defined as the sum of the differences between the 1PBE active site interatomic distances (from XRD) and those sampled from MD of the pHBH-FAD *apo* complex. A low score indicated a high structural similarity between the substrate-free PHBH conformations sampled during MD and the substrate-bound PHBH active site in 1PBE structure.
- ⁶⁶ Clarke CF (2000) New advances in coenzyme Q biosynthesis. Protoplasma. 213:134-147.

- ⁶⁷ Zhang KQ, Lin JW, Wang JH, Wu XW, Gao HL, Hsieh YC et al. (2014) A germline missense mutation in COQ6 is associated with susceptibility to familial schwannomatosis. Genet Med 16(10): 787-792.
- ⁶⁸ van Berkel WJH, Kamerbeek NM, Fraaije MW (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. J Biotechnol. 124:670-89.
- ⁶⁹ Huijbers MM, Montersino S, Westphal AH, Tischler D, van Berkel WJH (2014) Flavin dependent monooxygenases. Arch Biochem Biophys. 544:2-17.
- ⁷⁰ Ballou DP, Entsch B, Cole LJ (2005) Dynamics Involved in Catalysis by Single-Component and Two-Component Flavin-Dependent Aromatic Hydroxylases. Biochem Biophys Res Comm 338: 590–98.
- ⁷¹ Boehr DD, Nussinov R, Wright PE (2009) The role of dynamics conformational ensembles in biomolecular recognition. Nat Chem Biol 5:789-796.

III) Résumé et mots clefs en français

L'ubiquinone, ou coenzyme Q, est une molécule lipophile polyisoprényle présente dans toutes les membranes biologiques chez les eucaryotes et composée d'un noyau aromatique actif de façon rédox et d'une chaîne grasse. Elle joue un rôle clef dans la chaîne respiratoire et est un important antioxydant membranaire. Chez l'homme, des pathologies sévères sont associées à des mutations de gènes de la biosynthèse de l'ubiquinone. Chez S. cerevisiæ, la biosynthèse de l'ubiquinone est réalisée par un complexe multiprotéique situé à la membrane interne mitochondriale. Certaines étapes de cette voie de biosynthèse ne sont pas encore connues et très peu ont été caractérisées in vitro. L'étude présentée ici a permis d'améliorer la compréhension de l'étape d'hydroxylation en C-5 à laquelle sont associés Coq6, monooxygénase à flavine, ainsi que Arh1 et Yah1, une adrénodoxine réductase et une adrénodoxine. Nous avons réalisé la première purification de Coq6 de S. cerevisiæ avec son cofacteur flavinique et nous avons démontré in vitro l'existence d'une chaîne de transfert d'électrons du NADPH au FAD de Coq6 via l'homologue humain de Arh1 et Yah1. Les études enzymatiques menées avec différents analogues de substrats synthétisés n'ont pas permis de détecter d'activité enzymatique de Coq6 dans les conditions utilisées. Des études préliminaires de fluorescence nous ont néanmoins permis d'avancer une hypothèse quant au substrat de Coq6, qui n'est pas connu avec certitude. Nous avons également réalisé une caractérisation cinétique de la réduction du FAD de l'homologue humain de Arh1 par le NADH et le NADPH, révélant ainsi son comportement particulier avec le NADPH, notamment en présence de Mg²⁺.

MOTS CLEFS : ubiquinone, Coq6, monooxygénase à flavine, adrénodoxine réductase, adrénodoxine, *Saccarhomyces cerevisiae*

IV) Résumé et mots clefs en anglais

Coenzyme Q, or ubiquinone, is a lipophilic molecule found in all biological membranes in eukaryotes and composed of a redox active aromatic ring and a polyisoprenyl chain. It is a key electron carrier in the respiratory chain and a very important membrane soluble antioxidant. Severe pathologies in humans are associated with mutations in the ubiquinone biosynthesis genes. In S. cerevisiæ, ubiquinone biosynthesis is done by a multiproteic complex at the inner mitochondrial membrane. Some steps of the ubiquinone biosynthesis are still unknown and very few have been characterized in vitro. This study allowed us to better understand the C-5 hydroxylation step that is associated with Coq6, a flavin monooxygenase, Arh1, an adrenodoxin reductase and Yah1, an adrenodoxin. We achieved the first purification of S. cerevisiæ Coq6 with its flavin cofactor and we demonstrated in vitro the existence of an electron transfer chain from NADPH to Coq6 FAD via Arh1 human homologue and Yah1. Enzymatic studies made with several synthetic substrate analogues did not allow us to detect Coq6 enzymatic activity with the tested conditions. Nevertheless, preliminary fluorescence studies led us to make an assumption about Coq6 substrate which is still not well known. We also carried out a kinetic characterization of the NADPH or NADH reduction of Arh1 human homologue, showing its unusual behavior with NADPH, in particular when Mg^{2+} is present.

KEYWORDS : ubiquinone, Coq6, Flavin monooxygenase, adrenodoxin reductase, adrenodoxin, *Saccarhomyces cerevisiae*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Α

Aliverti, A.; Curti, B.; Vanoni, M. A. Identifying and Quantitating FAD and FMN in Simple and in Iron-Sulfur-Containing Flavoproteins. In *Flavoprotein protocols*; Springer, 1999; pp 9–23.

Allan, C. M.; Awad, A. M.; Johnson, J. S.; Shirasaki, D. I.; Wang, C.; Blaby-Haas, C. E.; Merchant, S. S.; Loo, J. A.; Clarke, C. F. Identification of Coq11, a New Coenzyme Q Biosynthetic Protein in the CoQ-Synthome in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (12), 7517–7534.

Allan, C. M.; Hill, S.; Morvaridi, S.; Saiki, R.; Johnson, J. S.; Liau, W.-S.; Hirano, K.; Kawashima, T.; Ji, Z.; Loo, J. A.; et al. A Conserved START Domain Coenzyme Q-Binding Polypeptide Is Required for Efficient Q Biosynthesis, Respiratory Electron Transport, and Antioxidant Function in Saccharomyces Cerevisiae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2013**, *1831*, 776–791.

В

Baradaran, R.; Berrisford, J. M.; Minhas, G. S.; Sazanov, L. A. Crystal Structure of the Entire Respiratory Complex I. *Nature* **2013**, *494* (7438), 443–448.

Barros, M. H.; Nobrega, F. G. YAH1 of Saccharomyces Cerevisiae: A New Essential Gene That Codes for a Protein Homologous to Human Adrenodoxin. *Gene* **1999**, *233* (1), 197–203.

Barros, M. H.; Nobrega, F. G.; Tzagoloff, A. Mitochondrial Ferredoxin Is Required for Heme A Synthesis inSaccharomyces Cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (12), 9997–10002.

Beilke, D.; Weiss, R.; Löhr, F.; Pristovšek, P.; Hannemann, F.; Bernhardt, R.; Rüterjans, H. A New Electron Transport Mechanism in Mitochondrial Steroid Hydroxylase Systems Based on Structural Changes upon the Reduction of Adrenodoxin. *Biochemistry* **2002**, *41* (25), 7969–7978.

Beinert, H. Semi-Micro Methods for Analysis of Labile Sulfide and of Labile Sulfide plus Sulfane Sulfur in Unusually Stable Iron-Sulfur Proteins. *Analytical biochemistry* **1983**, *131* (2), 373–378.

Bentinger, M.; Brismar, K.; Dallner, G. The Antioxidant Role of Coenzyme Q. *Mitochondrion* **2007**, *7*, S41–S50.

Bentinger, M.; Tekle, M.; Dallner, G. Coenzyme Q – Biosynthesis and Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *396* (1), 74–79.

Bogenstätter, M.; Limberg, A.; Overman, L. E.; Tomasi, A. L. Enantioselective Total Synthesis of the Kinesin Motor Protein Inhibitor Adociasulfate 1. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (51), 12206–12207.

Bouvier, F.; d' Harlingue, A.; Hugueney, P.; Marin, E.; Marion-Poll, A.; Camara, B. Xanthophyll Biosynthesis Cloning, Expression, Functional Reconstitution, and Regulation of B-Cyclohexenyl Carotenoid Epoxidase from Pepper (Capsicum Annuum). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (46), 28861–28867.

Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248–252.

Brandt, M. E.; Vickery, L. E. Expression and Characterization of Human Mitochondrial Ferredoxin Reductase in Escherichia Coli. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1992**, *294* (2), 735–740.

Bruns, C. M.; Karplus, A. P. Refined Crystal Structure of Spinach Ferredoxin Reductase at 1.7 Å Resolution: Oxidized, Reduced and 2'-Phospho-5'-AMP Bound States. *Journal of molecular biology* **1995**, *247* (1), 125–145.

С

Chacinska, A.; Pfanner, N.; Meisinger, C. How Mitochondria Import Hydrophilic and Hydrophobic Proteins. *TRENDS in Cell Biology* **2002**, *12* (7), 299–303.

Chesshyre, J. A.; Hipkiss, A. R. Low Temperatures Stabilize Interferon A-2 against Proteolysis in Methylophilus Methylotrophus and Escherichia Coli. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1989**, *31* (2), 158–162.

Cheng, W.; Li, W. Structural Insights into Ubiquinone Biosynthesis in Membranes. *Science* **2014**, *343* (6173), 878–881.

Chu, J.-W.; Kimura, T. Studies on Adrenal Steroid Hydroxylases Molecular and Catalytic Properties of Adrenodoxin Reductase (a Flavoprotein). *Journal of Biological Chemistry* **1973a**, *248* (6), 2089–2094.

Chu, J.-W.; Kimura, T. Studies on Adrenal Steroid Hydroxylases Complex Formation of the Hydroxylase Components. *Journal of Biological Chemistry* **1973b**, *248* (14), 5183–5187.

Claros, M. G.; Vincens, P. Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and Their Targeting Sequences. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *241* (3), 779–786.

Creutz, C.; Sutin, N. Kinetics of the Reactions of Sodium Dithionite with Dioxygen and Hydrogen Peroxide. *Inorganic Chemistry* **1974**, *13* (8), 2041–2043.

Crozier-Reabe, K.; Moran, G. Form Follows Function: Structural and Catalytic Variation in the Class A Flavoprotein Monooxygenases. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13* (12), 15601–15639.

D

Daff, S. An Appraisal of Multiple NADPH Binding-Site Models Proposed for Cytochrome P450 Reductase, NO Synthase, and Related Diflavin Reductase Systems. *Biochemistry* **2004**, *43* (13), 3929–3932.

Dai, Y.-N.; Zhou, K.; Cao, D.-D.; Jiang, Y.-L.; Meng, F.; Chi, C.-B.; Ren, Y.-M.; Chen, Y.; Zhou, C.-Z. Crystal Structures and Catalytic Mechanism of the C-Methyltransferase Coq5 Provide Insights into a Key Step of the Yeast Coenzyme Q Synthesis Pathway. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2014**, *D70*, 2085–2092.

Diggle, S. P.; Cornelis, P.; Williams, P.; Cámara, M. 4-Quinolone Signalling in Pseudomonas Aeruginosa: Old Molecules, New Perspectives. *International Journal of Medical Microbiology* **2006**, *296* (2-3), 83–91.

Doimo, M.; Desbats, M. A.; Cerqua, C.; Cassina, M.; Trevisson, E.; Salviati, L. Genetics of Coenzyme Q10 Deficiency. *Molecular Syndromology* **2014**.

Döring, F.; Schmelzer, C.; Lindner, I.; Vock, C.; Fujii, K. Functional Connections and Pathways of Coenzyme Q10-Inducible Genes: An in-Silico Study. *IUBMB Life* **2007**, *59* (10), 628–633.

Ε

Echtay, K. S.; Winkler, E.; Frischmuth, K.; Klingenberg, M. Uncoupling Proteins 2 and 3 Are Highly Active H+ Transporters and Highly Nucleotide Sensitive When Activated by Coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (4), 1416–1421.

Einarsdottir, G. H.; Stankovich, M. T.; Tu, S. C. Studies of Electron-Transfer Properties of Salicylate Hydroxylase from Pseudomonas Cepacia and Effects of Salicylate and Benzoate Binding. *Biochemistry* **1988**, *27* (9), 3277–3285.

Entsch, B.; Palfey, B. A.; Ballou, D. P.; Massey, V. Catalytic Function of TYrosine Residues in Para-Hydroxybenzoate Hydroxylase as Determined by the Study of Site-Directed Mutants. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (26), 17341–17349.

Entsch, B.; Van Berkel, W. J. Structure and Mechanism of Para-Hydroxybenzoate Hydroxylase. *The FASEB journal* **1995**, *9* (7), 476–483.

Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, Physiological and Medical Aspects of Ubiquinone Function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1995**, 1271 (1), 195–204.

Ewen, K. M.; Kleser, M.; Bernhardt, R. Adrenodoxin: The Archetype of Vertebrate-Type [2Fe–2S] Cluster Ferredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2011**, *1814* (1), 111–125.

F

Fischer, F.; Raimondi, D.; Aliverti, A.; Zanetti, G. *Mycobacterium Tuberculosis* FprA, a Novel Bacterial NADPH-Ferredoxin Reductase. *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269* (12), 3005–3013.

Fish, W. W. Rapid Colorimetric Micromethod for the Quantitation of Complexed Iron in Biological Samples. *Methods in Enzymology* **1988** *158*, 357-364

G

Gin, P.; Clarke, C. F. Genetic Evidence for a Multi-Subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (4), 2676–2681.

Gin, P.; Hsu, A. Y.; Rothman, S. C.; Jonassen, T.; Lee, P. T.; Tzagoloff, A.; Clarke, C. F. The Saccharomyces Cerevisiae COQ6 Gene Encodes a Mitochondrial Flavin-Dependent Monooxygenase Required for Coenzyme Q Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (28), 25308–25316.

Goewert, R. R.; Sippel, C. J.; Olson, R. E. Identification of 3, 4-Dihydroxy-5-Hexaprenylbenzoic Acid as an Intermediate in the Biosynthesis of Ubiquinone-6 by Saccharomyces Cerevisiae. *Biochemistry* **1981**, *20* (14), 4217–4223.

Goewert, R. R.; Sippel, C. J.; Grimm, M. F.; Olson, R. E. Identification of 3-Methoxy-4-Hydroxy-5-Hexaprenylbenzoic Acid as a New Intermediate in Ubiquinone Biosynthesis by Saccharomyces Cerevisiae. *Biochemistry* **1981**, *20* (19), 5611–5616.

Gómez-Díaz, C.; Rodriguez-Aguilera, J. C.; Barroso, M. P.; Villalba, J. M.; Navarro, F.; Crane, F. L.; Navas, P. Antioxidant Ascorbate Is Stabilized by NADH-Coenzyme Q10 Reductase in the Plasma Membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **1997**, *29* (3), 251–257.

González-Mariscal, I.; García-Testón, E.; Padilla, S.; Martín-Montalvo, A.; Pomares Viciana, T.; Vazquez-Fonseca, L.; Gandolfo Domínguez, P.; Santos-Ocaña, C. The Regulation of Coenzyme Q Biosynthesis in Eukaryotic Cells: All That Yeast Can Tell Us. *Molecular Syndromology* **2014**, *5* (3-4), 107–118.

н

Hajj Chehade, M.; Loiseau, L.; Lombard, M.; Pecqueur, L.; Ismail, A.; Smadja, M.; Golinelli-Pimpaneau, B.; Mellot-Draznieks, C.; Hamelin, O.; Aussel, L.; et al. ubil, a New Gene in Escherichia Coli Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-Hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (27), 20085–20092.

Hamilton, S. J.; Chew, G. T.; Watts, G. F. Therapeutic Regulation of Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* **2007**, 89.

Han, X.; Chen, C.-C.; Kuo, C.-J.; Huang, C.-H.; Zheng, Y.; Ko, T.-P.; Zhu, Z.; Feng, X.; Wang, K.; Oldfield, E.; et al. Crystal Structures of Ligand-Bound Octaprenyl Pyrophosphate Synthase from *Escherichia Coli* Reveal the Catalytic and Chain-Length Determining Mechanisms: Crystal Structure of *E. Coli* OPPs. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2015**, *83* (1), 37–45.

He, C. H.; Black, D. S.; Nguyen, T. P. T.; Wang, C.; Srinivasan, C.; Clarke, C. F. Yeast Coq9 Controls Deamination of Coenzyme Q Intermediates That Derive from Para-Aminobenzoic Acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2015**, *1851* (9), 1227–1239.

He, C. H.; Xie, L. X.; Allan, C. M.; Tran, U. C.; Clarke, C. F. Coenzyme Q Supplementation or over-Expression of the Yeast Coq8 Putative Kinase Stabilizes Multi-Subunit Coq Polypeptide Complexes in Yeast< I> Coq</i> Null Mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (4), 630–644.

Heeringa, S. F.; Chernin, G.; Chaki, M.; Zhou, W.; Sloan, A. J.; Ji, Z.; Xie, L. X.; Salviati, L.; Hurd, T. W.; Vega-Warner, V.; et al. COQ6 Mutations in Human Patients Produce Nephrotic Syndrome with Sensorineural Deafness. *Journal of Clinical Investigation* **2011**, *121* (5), 2013–2024.

Howell, L. G.; Spector, T.; Massey, V. Purification and Properties of P-Hydroxybenzoate Hydroxylase from Pseudomonas Fluorescens. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247* (13), 4340–4350.

L

Inaba, K. Disulfide Bond Formation System in Escherichia Coli. *Journal of Biochemistry* **2009**, *146* (5), 591–597.

Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, T.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ramaswamy, S.; Jap, B. K. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex. *Science* **1998**, *281* (5373), 64–71.

К

Kapust, R. B.; Waugh, D. S. Escherichia Coli Maltose-Binding Protein Is Uncommonly Effective at Promoting the Solubility of Polypeptides to Which It Is Fused. *Protein Science* **1999**, *8* (08), 1668–1674.

Katagiri, M.; Takemori, S. Reaction Mechanism of NAD(P)H-Linked Oxygenases 1+ 2. *Molecular and cellular biochemistry* **1973**, *2* (2), 137–152.

Kiefhaber, T.; Rudolph, R.; Kohler, H. H.; Buchner, J. Protein Aggregation *in vitro* and *in vivo*: a Quantitative Model of the Kinetic Competition Between Folding and Aggregation. *Biotechnology (N Y)* **1991**, *9*(*9*), 825-829.

Kitagawa, T.; Sakamoto, H.; Sugiyama, T.; Yamano, T. Formation of the Semiquinone Form in the Anaerobic Reduction of Adrenodoxin Reductase by NADPH. Resonance Raman, EPR, and Optical Spectroscopic Evidence. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257* (20), 12075–12080.

Kwon, O.; Kotsakis, A.; Meganathan, R. Ubiquinone (coenzyme Q) Biosynthesis in Escherichia Coli: Identification of the ubiF Gene. *FEMS microbiology letters* **2000**, *186* (2), 157–161.

L

Lacour, T.; Achstetter, T.; Dumas, B. Characterization of Recombinant Adrenodoxin Reductase Homologue (Arh1p) from Yeast Implication in Nitro Cytochrome P45011β Monooxygenase System. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (37), 23984–23992.

Laden, B. P.; Tang, Y.; Porter, T. D. Cloning, Heterologous Expression, and Enzymological Characterization of Human Squalene Monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *374* (2), 381–388.

Lambeth, J. D.; Kamin, H. Adrenodoxin Reductase. Properties of the Complexes of Reduced Enzyme with NADP+ and NADPH. *Journal of Biological Chemistry* **1976**, *251* (14), 4299–4306.

Lambeth, J. D.; McCaslin, D. R.; Kamin, H. Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin Complex. *J. Biol. Chem* **1976**, *251*, 7545–7550.

Lang, M.; Mühlbauer, A.; Gräf, C.; Beyer, J.; Lang-Fugmann, S.; Polborn, K.; Steglich, W. Studies on the Structure and Biosynthesis of Tridentoquinone and Related Meroterpenoids from the MushroomSuillus Tridentinus (Boletales). *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008* (5), 816–825.

Lang, M.; Steglich, W. An Effective Method for the Synthesis of 13C-Labeled Polyprenylhydroxybenzoic Acids. *Synthesis* **2005**, No. 6, 1019–1027.

Lange, H.; Kaut, A.; Kispal, G.; Lill, R. A Mitochondrial Ferredoxin Is Essential for Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (3), 1050–1055.

Laredj, L. N.; Licitra, F.; Puccio, H. M. The Molecular Genetics of Coenzyme Q Biosynthesis in Health and Disease. *Biochimie* **2014**, *100*, 78–87.

Lenaz, G.; Genova, M. L. Mobility and Function of Coenzyme Q (ubiquinone) in the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2009**, *1787* (6), 563–573.

Li, J.; Saxena, S.; Pain, D.; Dancis, A. Adrenodoxin Reductase Homolog (Arh1p) of Yeast Mitochondria Required for Iron Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (2), 1503–1509.

Li, L.; Porter, T. D. Hepatic Cytochrome P450 Reductase-Null Mice Reveal a Second Microsomal Reductase for Squalene Monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *461* (1), 76–84.

Lill, R. Function and Biogenesis of Iron–sulphur Proteins. Nature 2009, 460 (7257), 831–838.

Loenarz, C.; Schofield, C. J. Expanding Chemical Biology of 2-Oxoglutarate Oxygenases. *Nature chemical biology* **2008**, *4* (3), 152–156.

Lohman, D. C.; Forouhar, F.; Beebe, E. T.; Stefely, M. S.; Minogue, C. E.; Ulbrich, A.; Stefely, J. A.; Sukumar, S.; Luna-Sanchez, M.; Jochem, A.; et al. Mitochondrial COQ9 Is a Lipid-Binding Protein That Associates with COQ7 to Enable Coenzyme Q Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (44), E4697–E4705.

Lu, T.-T.; Jae Lee, S.; Apfel, U.-P.; Lippard, S. J. Aging-Associated Enzyme Human Clock-1: Substrate-Mediated Reduction of the Diiron Center for 5-Demethoxyubiquinone Hydroxylation. *Biochemistry* **2013**, *52* (13), 2236–2244.

Μ

de Marco, A.; Deuerling, E.; Mogk, A.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. Chaperone-Based Procedure to Increase Yields of Soluble Recombinant Proteins Produced in E. Coli. *BMC Biotechnology* **2007**, *7* (1), 32.

Manzella, L.; Barros, M. H.; Nobrega, F. G. ARH1 of Saccharomyces Cerevisiae: A New Essential Gene That Codes for a Protein Homologous to the Human Adrenodoxin Reductase. *Yeast* **1998**, *14*, 839–846.

Marbois, B. N.; Clarke, C. F. The COQ7 Gene Encodes a Protein in Saccharomyces Cerevisiae Necessary for Ubiquinone Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (6), 2995–3004.

Marbois, B.; Gin, P.; Faull, K. F.; Poon, W. W.; Lee, P. T.; Strahan, J.; Shepherd, J. N.; Clarke, C. F. Coq3 and Coq4 Define a Polypeptide Complex in Yeast Mitochondria for the Biosynthesis of Coenzyme Q. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (21), 20231–20238.

Marbois, B.; Xie, L. X.; Choi, S.; Hirano, K.; Hyman, K.; Clarke, C. F. Para-Aminobenzoic Acid Is a Precursor in Coenzyme Q6 Biosynthesis in Saccharomyces Cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (36), 27827–27838.

Martín-Montalvo, A.; González-Mariscal, I.; Padilla, S.; Ballesteros, M.; Brautigan, D. L.; Navas, P.; Santos-Ocaña, C. Respiratory-Induced Coenzyme Q Biosynthesis Is Regulated by a Phosphorylation Cycle of Cat5p/Coq7p. *Biochemical Journal* **2011**, *440* (1), 107–114.

Martin-Montalvo, A.; Gonzalez-Mariscal, I.; Pomares-Viciana, T.; Padilla-Lopez, S.; Ballesteros, M.; Vazquez-Fonseca, L.; Gandolfo, P.; Brautigan, D. L.; Navas, P.; Santos-Ocana, C. The Phosphatase Ptc7 Induces Coenzyme Q Biosynthesis by Activating the Hydroxylase Coq7 in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (39), 28126–28137.

Massey, V.; Ganther, H. On the Interpretation of the Absorption Spectra of Flavoproteins with Special Reference to D-Amino Acid Oxidase. *Biochemistry* **1965**, *4* (6), 1161–1173.

Massey, V.; Ghisla, S. Role of Charge-TransferInteractions in Flavoprotein Catalysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1974**, *227* (1), 446–465.

Massey, V.; Hemmerich, P. Photoreduction of Flavoproteins and Other Biological Compounds Catalazed by Deazaflavins. *Biochemistry* **1978**, *17*(1), 9–17

McLean, K.; Scrutton, N.; Munro, A. Kinetic, Spectroscopic and Thermodynamic Characterization of the Mycobacterium Tuberculosis Adrenodoxin Reductase Homologue FprA. *Biochem. J* **2003**, *372*, 317–327.

Medina, M. Structural and Mechanistic Aspects of Flavoproteins: Photosynthetic Electron Transfer from Photosystem I to NADP⁺. *FEBS Journal* **2009**, *276* (15), 3942–3958.

Mitchell, P. The Protonmotive Q Cycle: A General Formulation. *FEBS letters* **1975**, *59* (2), 137–139.

Moon, A. F.; Mueller, G. A.; Zhong, X.; Pedersen, L. C. A Synergistic Approach to Protein Crystallization : Combination of a Fixed-Arm Carrier with Surface Entropy Reduction. *Protein Science* **2010**, *19*, 901-913.

Müller, F. Flavin Radicals: Chemistry and Biochemistry. *Free Radical Biology & Medicine* **1987**, *3*, 215–230.

Müller, J. J.; Lapko, A.; Bourenkov, G.; Ruckpaul, K.; Heinemann, U. Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin Complex Structure Suggests Electron Transfer Path in Steroid Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (4), 2786–2789.

Ν

Nonaka, Y.; Fujii, S.; Yamano, T. The Semiquinone State of NADPH-Adrenodoxin Oxidoreductase in the Course of Anaerobic Redaction with NADPH. *Journal of biochemistry* **1986**, *99* (3), 803–814.

Nowicka, B.; Kruk, J. Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2010**, *1797* (9), 1587–1605.

0

Okada, K.; Suzuki, K.; Kamiya, Y.; Zhu, X.; Fujisaki, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Nakagawa, T.; Kawamukai, M.; Matsuda, H. Polyprenyl Diphosphate Synthase Essentially Defines the Length of the Side Chain of Ubiquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, *1302*, 217–223.

Ozeir, M.; Mühlenhoff, U.; Lill, R.; Fontecave, M.; Pierrel, F. Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency. *Chemistry* & *Biology* **2011**, *18*, 1134–1142.

Ρ

Padilla, S.; Tran, U. C.; Jiménez-Hidalgo, M.; López-Martín, J. M.; Martín-Montalvo, A.; Clarke, C. F.; Navas, P.; Santos-Ocaña, C. Hydroxylation of Demethoxy-Q6 Constitutes a Control Point in Yeast Coenzyme Q6 Biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66* (1), 173–186.

Papucci, L.; Schiavone, N.; Witort, E.; Donnini, M.; Lapucci, A.; Tempestini, A.; Formigli, L.; Zecchi-Orlandini, S.; Orlandini, G.; Carella, G.; et al. Coenzyme Q10 Prevents Apoptosis by Inhibiting Mitochondrial Depolarization Independently of Its Free Radical Scavenging Property. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (30), 28220–28228.

Patil, P. P.; Ballou, D. P. The Use of Protocatechuate Dioxygenase for Maintaining Anaerobic Conditions in Biochemical Experiments. *Analytical Biochemistry* **2000**, *286*, 187–192.

Pennati, A.; Razeto, A.; de Rosa, M.; Pandini, V.; Vanoni, M. A.; Mattevi, A.; Coda, A.; Aliverti, A.; Zanetti, G. Role of the His57–Glu214 Ionic Couple Located in the Active Site of *Mycobacterium Tuberculosis* FprA. *Biochemistry* **2006**, *45* (29), 8712–8720.

Pierrel, F.; Hamelin, O.; Douki, T.; Kieffer-Jaquinod, S.; Mühlenhoff, U.; Ozeir, M.; Lill, R.; Fontecave, M. Involvement of Mitochondrial Ferredoxin and Para-Aminobenzoic Acid in Yeast Coenzyme Q Biosynthesis. *Chemistry & Biology* **2010**, *17* (5), 449–459.

Poon, W. W.; Barkovich, R. J.; Hsu, A. Y.; Frankel, A.; Lee, P. T.; Shepherd, J. N.; Myles, D. C.; Clarke, C. F. Yeast and Rat Coq3 and Escherichia Coli UbiG Polypeptides Catalyze Both O-Methyltransferase Steps in Coenzyme Q Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (31), 21665–21672.

Poon, W. W.; Do, T. Q.; Marbois, B. N.; Clarke, C. F. Sensitivity to Treatment with Polyunsaturated Fatty Acids Is a General Characteristic of the Ubiquinone-Deficient Yeast Coq Mutants. *Molecular Aspects of Medecine* **1997**, *18*, s121–s127.

R

Rich, P. R. Electron and Proton Transfers Through Quinones and Cytochrome bc Complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1984**, *768* (1), 53–79.

S

Sabri, M.; Dunford, A. J.; McLean, K. J.; Neeli, R.; Scrutton, N. S.; Leys, D.; Munro, A. W. Characterization of Coenzyme Binding and Selectivity Determinants in Mycobacterium Tuberculosis Flavoprotein Reductase A: Analysis of Arg199 and Arg200 Mutants at the NADP(H) 2'-Phosphate Binding Site. *Biochemical Journal* **2009**, *417* (1), 103.

Sazanov, L. A. A Giant Molecular Proton Pump: Structure and Mechanism of Respiratory Complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2015**, *16* (6), 375–388.

Schein, C.H. Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *BioTechnology* **1989**, *7*, 1141-1148.

Schreuder, H. A.; Prick, P. A.; Wierenga, R. K.; Vriend, G.; Wilson, K. S.; Hol, W. G.; Drenth, J. Crystal Structure of the P-Hydroxybenzoate Hydroxylase-Substrate Complex Refined at 1.9 \AA Resolution: Analysis of the Enzyme-Substrate and Enzyme-Product Complexes. *Journal of molecular biology* **1989**, *208* (4), 679–696.

Sheftel, A. D.; Stehling, O.; Pierik, A. J.; Elsässer, H.-P.; Mühlenhoff, U.; Webert, H.; Hobler, A.; Hannemann, F.; Bernhardt, R.; Lill, R. Humans Possess Two Mitochondrial Ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with Distinct Roles in Steroidogenesis, Heme, and Fe/S Cluster Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (26), 11775–11780.

Shen, Y.; Goldsmith-Fischman, S.; Atreya, H. S.; Acton, T.; Ma, L.; Xiao, R.; Honig, B.; Montelione, G. T.; Szyperski, T. NMR Structure of the 18 kDa Protein CC1736 from Caulobacter Crescentus Identifies a Member of the "START" Domain Superfamily and Suggests Residues Mediating Substrate Specificity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004**, *58* (3), 747–750.

Shepherd, J. A.; Poon, W. W.; Myles, D. C.; Clarke, C. F. The Biosynthesis of Ubiquinone: Synthesis and Enzymatic Modification of Biosynthetic Precursors. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37* (14), 2395–2398.

Stefely, J. A.; Reidenbach, A. G.; Ulbrich, A.; Oruganty, K.; Floyd, B. J.; Jochem, A.; Saunders, J. M.; Johnson, I. E.; Minogue, C. E.; Wrobel, R. L.; et al. Mitochondrial ADCK3 Employs an Atypical Protein Kinase-like Fold to Enable Coenzyme Q Biosynthesis. *Molecular Cell* **2015**, *57* (1), 83–94.

Sun, F.; Huo, X.; Zhai, Y.; Wang, A.; Xu, J.; Su, D.; Bartlam, M.; Rao, Z. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell* **2005**, *121* (7), 1043–1057.

Swiezewska, E.; Dallner, G.; Andersson, B.; Ernster, L. Biosynthesis of Ubiquinone and Plastoquinonein the Endoplasmic Reticulum-Golgi Membranes of Spinach Leaves. **1993**, *268* (2), 1494–1499.

Т

Tran, U. C.; Clarke, C. F. Endogenous Synthesis of Coenzyme Q in Eukaryotes. *Mitochondrion* **2007**, *75*, S62–S71.

Tran, U. C.; Marbois, B.; Gin, P.; Gulmezian, M.; Jonassen, T.; Clarke, C. F. Complementation of Saccharomyces Cerevisiae coq7 Mutants by Mitochondrial Targeting of the Escherichia Coli UbiF Polypeptide: TWO FUNCTIONS OF YEAST COQ7 POLYPEPTIDE IN COENZYME Q BIOSYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (24), 16401–16409.

Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and Function of Coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1660* (1-2), 171–199.

Tzagoloff, A.; Dieckmann, C. L. PET Genes of Saccharomyces Cerevisiae. *Microbiological reviews* **1990**, *54* (3), 211–225.

۷

Valeur, B. Effects of Intermolecular Photophysical Processes on Fluorescence Emission. In *Molecular Fluorescence: Principles and Applications ;* Wiley, 2001; pp 72-90.

Van Berkel, W. J. H.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. Flavoprotein Monooxygenases, a Diverse Class of Oxidative Biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **2006**, *124* (4), 670–689.

Vonrhein, C.; Schmidt, U.; Ziegler, G. A.; Schweiger, S.; Hanukoglu, I.; Schulz, G. E. Chaperone-Assisted Expression of Authentic Bovine Adrenodoxin Reductase in Escherichia Coli. *FEBS letters* **1999**, *443* (2), 167–169.

w

Webert, H.; Freibert, S.-A.; Gallo, A.; Heidenreich, T.; Linne, U.; Amlacher, S.; Hurt, E.; Mühlenhoff, U.; Banci, L.; Lill, R. Functional Reconstitution of Mitochondrial Fe/S Cluster Synthesis on Isu1 Reveals the Involvement of Ferredoxin. *Nature Communications* **2014**, *5*, 5013.

Wheeler, B.; Jia, Z. Preparation and Characterization of Human ADCK3, a Putative Atypical Kinase. *Protein Expression and Purification* **2015**, *108*, 13–17.

White-Stevens, R. H.; Kamin, H.; Gibson, Q. H. Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase II. Enzyme Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247* (8), 2371–2381.

White-Stevens, R. H.; Kamin, H. Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase I. Preparation, Properties, and the Uncoupling of Oxygen Reduction from Hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247* (8), 2358–2370.

Wiedemann, N.; Frazier, A. E.; Pfanner, N. The Protein Import Machinery of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (15), 14473–14476.

Wolthers, K. R.; Scrutton, N. S. Protein Interactions in the Human Methionine Synthase–Methionine Synthase Reductase Complex and Implications for the Mechanism of Enzyme Reactivation ⁺. *Biochemistry* **2007**, *46* (23), 6696–6709.

Х

Xie, L. X.; Hsieh, E. J.; Watanabe, S.; Allan, C. M.; Chen, J. Y.; Tran, U. C.; Clarke, C. F. Expression of the Human Atypical Kinase ADCK3 Rescues Coenzyme Q Biosynthesis and Phosphorylation of Coq Polypeptides in Yeast coq8 Mutants. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1811* (5), 348–360.

Xie, L. X.; Ozeir, M.; Tang, J. Y.; Chen, J. Y.; Jaquinod, S.-K.; Fontecave, M.; Clarke, C. F.; Pierrel, F. Overexpression of the Coq8 Kinase in Saccharomyces Cerevisiae Coq Null Mutants Allows for Accumulation of Diagnostic Intermediates of the Coenzyme Q6 Biosynthetic Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (28), 23571–23581.

Xie, L. X.; Williams, K. J.; He, C. H.; Weng, E.; Khong, S.; Rose, T. E.; Kwon, O.; Bensinger, S. J.; Marbois, B. N.; Clarke, C. F. Resveratrol and *para* -Coumarate Serve as Ring Precursors for Coenzyme Q Biosynthesis. *Journal of Lipid Research* **2015**, *56* (4), 909–919.
Xu, D.; Ballou, D. P.; Massey, V. Studies of the Mechanism of Phenol Hydroxylase: Mutants Tyr289Phe, Asp54Asn, and Arg281Met⁺. *Biochemistry* **2001**, *40* (41), 12369–12378.

Ζ

Zhang, K.; Lin, J.-W.; Wang, J.; Wu, X.; Gao, H.; Hsieh, Y.-C.; Hwu, P.; Liu, Y.-R.; Su, L.; Chiou, H.-Y.; et al. A Germline Missense Mutation in COQ6 Is Associated with Susceptibility to Familial Schwannomatosis. *Genetics in Medicine* **2014**, *16* (10), 787–792.

Zhang, M.; Wakitani, S.; Hayashi, K.; Miki, R.; Kawamukai, M. High Production of Sulfide in Coenzyme Q Deficient Fission Yeast. *BioFactors* **2008**, *32*, 91–98.

Ziegler, G. A.; Schulz, G. E. Crystal Structures of Adrenodoxin Reductase in Complex with NADP⁺ and NADPH Suggesting a Mechanism for the Electron Transfer of an Enzyme Family. *Biochemistry* **2000**, *39* (36), 10986–10995.