



HAL
open science

Mécanisme d'assemblage des centres fer-soufre, rôle de la frataxine

Sylvain Gervason

► **To cite this version:**

Sylvain Gervason. Mécanisme d'assemblage des centres fer-soufre, rôle de la frataxine. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL110 . tel-04010757

HAL Id: tel-04010757

<https://theses.hal.science/tel-04010757>

Submitted on 2 Mar 2023

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.

Mécanisme d'assemblage des centres fer-soufre, rôle de la frataxine

Iron-sulfur cluster assembly mechanism, role of frataxin

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577 :

Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité du doctorat : Science de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

Graduate school : Life Science and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 14 décembre 2021, par

Sylvain GERVASON

Composition du Jury

Nicolas ROUHIER

Professeur des Universités,
IAM, Université de Lorraine

Président

**Sandrine OLLAGNIER DE
CHOUDENS**

Directrice de Recherche,
LCBM, Université Grenoble Alpes

Rapporteur & Examinatrice

Sophie RAHUEL-CLERMONT

Directrice de Recherche,
IMoPA, Université de Lorraine

Rapporteur & Examinatrice

Anne DURAND

Maîtresse de Conférences,
I2BC, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Béatrice PY

Directrice de Recherche,
LCB, Université Aix-Marseille

Examinatrice

Direction de la thèse

Benoît D'AUTRÉAUX

Chargé de Recherche,
I2BC, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Titre : Mécanisme d'assemblage des centres fer-soufre, rôle de la frataxine

Mots clés : fer-soufre, metalloenzymes, ataxie de Friedreich, frataxine, biochimie, biophysique

Résumé : La biosynthèse des centres Fe-S est un processus impliquant un très grand nombre de protéines et la déficience de l'une de ces protéines conduit à des pathologies sévères : anémie, processus neurodégénératif, diabète, hypertrophie cardiaque et même cancers. Ces centres Fe-S sont des groupements prosthétiques de protéines impliquées dans une multitude de processus redox tels que la production d'ATP, la catalyse enzymatique, la synthèse protéique ou encore la maintenance de l'intégrité du génome. Les stratégies thérapeutiques basées sur le développement de composés capable de mimer la fonction des protéines assurant la synthèse des centres Fe-S sont peu développées en raison du manque d'information sur les mécanismes moléculaires et biochimiques de synthèse de ces cofacteurs métalliques particulièrement versatiles. Le projet de thèse s'est principalement intéressé à l'élucidation du mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC et au rôle fonctionnel de la frataxine dans ce processus qui est

une protéine centrale dont le défaut d'expression conduit à l'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative et cardiaque. En effet, la séquence d'assemblage de ces centres Fe-S était mal défini notamment sur la coordination de l'insertion du fer et du soufre pour former un centre polynucléaire Fe-S. De plus, la nature du produit final de cette machinerie ISC était sujette à débat : [2Fe2S] ou [4Fe4S]. L'objectif principal de ce projet de thèse était de reconstituer in vitro la machinerie d'assemblage des centres Fe-S, eucaryote et procaryote, à partir des protéines purifiées afin de déterminer les bases biochimiques et structurales du processus d'assemblage en utilisant un panel de techniques biochimiques (cinétique d'assemblage, test d'alkylation) et biophysiques (spectroscopies Mössbauer, RMN, RPE, spectrométrie de masse native et dichroïsme circulaire), dans le but de comprendre comment les centres Fe-S sont synthétisés et comment la frataxine régule ce processus.

Title : Iron-sulfur cluster assembly mechanism, role of frataxin

Keywords : iron-sulfur, metalloenzymes, Friedreich's ataxia, frataxin, biochemistry, biophysics

Abstract : Iron-sulfur clusters biogenesis is a process involving numerous proteins and the defects of one of them lead to severe diseases such as anaemia, neurodegenerative process, diabetes, cardiac hypertrophy and cancers. Iron-sulfur (Fe-S) clusters are critical prosthetic groups of proteins involved in redox processes such as ATP production, enzymatic catalysis, protein synthesis and maintenance of genome integrity. Therapeutic strategies based on the development of drugs mimicking the function of the proteins that perform the synthesis of these clusters are still in their infancy due to the lack of understanding of the exact molecular and biochemical mechanisms of their synthesis. The PhD project has mainly focused on the mechanism of Fe-S cluster biosynthesis by the ISC machinery and the functional role of frataxin in this process, a key regulator of the whole process, for which a defective

expression leads to Friedreich's ataxia, a severe neurodegenerative and cardiac disease. Indeed, the assembly sequence of these Fe-S clusters was poorly defined, especially on the coordination of the insertion of iron and sulfur to form a polynuclear Fe-S cluster. Moreover, the nature of the final product of this ISC machinery was subject to debate: [2Fe2S] or [4Fe4S]. The global aim of the PhD project was to reconstitute the Fe-S cluster assembly machinery, eukaryote and prokaryote, with purified proteins to determine the structural basis of the assembly process using a panel of biochemical (kinetics, alkylation assay) and biophysical (Mössbauer, NMR, circular dichroism and EPR spectroscopies and native mass spectrometry) techniques, in order to understand how Fe-S clusters are synthesized and how frataxin regulates this process.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse Benoit d'AUTRÉAUX qui m'a permis de réaliser ces quatre ans de thèse. De par ta confiance, ta patience, ta disponibilité, ta positivité, ta rigueur et ton soutien ma thèse s'est déroulée dans de bonnes conditions. Tu as toujours été là même dans les moments les plus durs de la thèse où les résultats n'étaient pas toujours au rendez-vous. Grâce à toi j'ai pu découvrir le domaine des métalloprotéines et surtout les centres Fe-S, mais tu m'as surtout donné envie de continuer dans la recherche et plus spécifiquement dans la biochimie. Pour tout cela, je te remercie grandement.

Je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté de consacrer du temps pour évaluer mes travaux de thèse, le Dr. Sandrine OLLAGNIER DE CHOUDENS et le Dr. Sophie RAHUEL-CLERMONT en tant que rapporteurs, et le Pr. Nicolas ROUHIER, Dr. Béatrice PY et Dr. Anne DURAND en tant qu'examineurs. Je remercie également Anne DURAND, Olivier BERTAUD et Soufian OUCHANE qui ont participé à mes comités de thèse.

Je tiens également à remercier Michel TOLEDANO, responsable du laboratoire, pour sa bienveillance et ses discussions scientifiques. Je remercie également tous les membres du laboratoire (anciens et nouveaux) pour tous ces bons moments partagés au cours de la thèse : Agnès, Gwen, Marouane, Lionel, Batoul, Aurélie (toxic player), Beata, Julien, Asher, Omar, Manon, Wafa, Kristian, Nadine. Je tiens à remercier particulièrement Marouane (alias BIBI) avec qui je me suis lié d'amitié, pour tous ces bons moments (la salle de sport et FIFA), ses précieux conseils, sa disponibilité et toutes nos discussions de tout et rien (et scientifiques) durant ma thèse ! Je remercie également tous les membres du bâtiment 142 pour leur bienveillance et leur disponibilité.

Je remercie également tous nos collaborateurs : Christina SIZUN pour toute ton aide et ta disponibilité pour la RMN ; Sarah CIANFÉRANI et ses étudiants : Thomas, Rania et Oscar pour leur aide et leur disponibilité pour la spectrométrie de masse ; Ludovic PECQUEUR pour ton aide en cristallographie ; Bénédicte BURLAT et son équipe pour leurs précieux conseils en spectroscopie RPE ; Mickaël CHERRIER et Yvain NICOLET pour leur aide en microscopie électronique ; Volker SCHÜNEMANN et son équipe en particulier Christina pour toute leur aide et conseil en spectroscopie Mössbauer ; Rafal DUTKIEWICZ et Malgorzata KLECZEWSKA pour la préparation des protéines bactérienne.

Je remercie également tous mes amis qui m'ont permis de penser à autre chose durant ma thèse : Samuel, Andrea, Olivier, Valentin, Victor, Joeffrey, Guillaume et Coco. Pour finir je tiens à remercier ma famille, mes parents Yves et Nathalie, mon frère Cyril pour leur soutien. Je remercie également ma copine Doriane de m'avoir soutenu et encouragé, surtout pendant la dernière année de thèse. Sa présence à mes côtés m'a donné la force morale pour arriver au bout de ce travail.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	12
PRÉAMBULE	13
CHAPITRE 1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. HOMEOSTASIE DU FER	15
1.1 <i>Homéostasie du fer chez les eucaryotes</i>	15
1.1.1 Métabolisme systémique du fer	16
1.1.1.1 Répartition du fer dans le corps	16
1.1.1.2 Absorption du fer au niveau du duodénum	16
1.1.1.3 Utilisation du fer	17
1.1.2 Métabolisme du fer intracellulaire	18
1.1.2.1 Acquisition du fer cellulaire	18
1.1.2.2 Distribution du fer cellulaire dans les organelles	20
1.1.2.3 Stockage du fer	21
1.1.2.4 Utilisation du fer cellulaire	22
1.2 <i>Homéostasie du fer chez E. coli</i>	23
1.2.1 Acquisition du fer	23
1.2.1.1 Acquisition du fer ferrique par les sidérophores	23
1.2.1.2 Acquisition du fer ferreux : le système Feo	25
1.2.2 Stockage du fer	26
1.3 <i>Régulation du métabolisme du fer</i>	27
1.3.1 Régulation du métabolisme du fer chez les eucaryotes	27
1.3.1.1 Régulation du métabolisme systémique du fer	27
1.3.1.2 La régulation du métabolisme du fer intracellulaire, le rôle clé de la biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes	27
1.3.2 Régulation du fer et des centres Fe-S dans les bactéries	30
2. LES CENTRES FER-SOUFRE (FE-S)	32
2.1 <i>La diversité des centres Fe-S</i>	32
2.2 <i>Le rôle des centres Fe-S</i>	34
2.2.1 Le transfert d'électron : exemple de la chaîne respiratoire mitochondriale	34
2.2.2 La catalyse redox: exemple des enzymes à radical S- adénosyl méthionine (SAM)	36
2.2.3 La catalyse non redox: exemple de l'aconitase	37
2.2.4 L'interaction avec l'ADN : exemple de l'hélicase XPD	38
3. LA BIOGENESE DES CENTRES FE-S	39
3.1 <i>Les différentes machineries de biosynthèse des centres Fe-S</i>	40
3.2 <i>Description de la machinerie ISC</i>	44
3.2.1 La protéine d'échafaudage IscU/ISCU	46
3.2.1.1 Phénotypes cellulaires	46
3.2.1.2 Structure et fonction	46
3.2.2 Les cystéines désulfurase IscS et NFS1	49
3.2.2.1 Phénotypes cellulaires	49
3.2.2.2 Structure et fonction	50
3.2.3 La ferrédoxine Fdx/FDX2	54
3.2.3.1 Phénotypes cellulaires	54
3.2.3.2 Structure et fonction	55
3.2.4 La frataxine	56
3.2.4.1 Phénotypes cellulaires	56
3.2.4.2 L'ataxie de Friedreich	57
3.2.4.3 Localisation, maturation et structure	58

3.2.5 Les protéines de transfert.....	60
3.2.6 Les protéines relais	61
3.2.7 Protéines ISCA et protéines intervenant plus tardivement.....	62
3.3 Lien entre les machineries mitochondriale ISC et cytosolique CIA.....	63
3.4 Mécanisme de biosynthèse par la machinerie ISC.....	65
3.4.1 La source de fer.....	65
3.4.2 Insertion du soufre.....	66
3.4.3 Processus de réduction des persulfures en ions sulfure	68
3.4.4 Rôle de la frataxine dans la biosynthèse de centres Fe-S	69
3.4.5 Nature du centre Fe-S formé par ISCU, [2Fe2S] ou [4Fe4S] ?	74
4. OBJECTIFS DE LA THESE.....	75
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	76
1. MATÉRIELS BIOLOGIQUES	76
1.1 Plasmides utilisés pour la surexpression des protéines recombinantes.....	76
1.2 Souches bactériennes	78
1.3 Transformation bactérienne.....	78
2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES.....	79
2.1 Production des protéines recombinantes	79
2.1.1 Milieu de culture.....	79
2.1.2 Surexpression des protéines d'intérêts.....	79
2.2 Purification des protéines recombinantes	79
2.2.1 Extraction protéique	79
2.2.2 Chromatographie d'affinité métallique immobilisé.....	80
2.2.3 Clivage de l'étiquette 6xHis.....	80
2.2.4 Chromatographie d'exclusion de taille	80
2.2.5 Préparation des échantillons en conditions anaérobie.....	81
2.2.6 Détermination de la concentration des protéines	81
3. METHODES BIOCHIMIQUES.....	82
3.1 Cinétique d'assemblage des centres Fe-S.....	82
3.2 Méthode d'alkylation des persulfures	82
3.3 Quantification du zinc dans ISCU.....	83
4. METHODES BIOPHYSIQUES.....	84
4.1 Dichroïsme circulaire	84
4.2 La spectroscopie Mössbauer	84
4.3 La spectroscopie RMN	85
4.4 La spectrométrie de masse.....	85
4.5 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE).....	86
CHAPITRE 3 PRÉPARATION DES PROTÉINES ET DES COMPLEXES	88
1. PURIFICATION DES PROTEINES.....	88
1.1 Purification de la cystéine désulfurase NFS1	88
1.2 Purification de la protéine échafaudage ISCU.....	93
1.3 Purification de la frataxine	94
1.4 Purification de la ferrédoxine	96
2. METHODE D'ALKYLATION ARBS	97
3. ARTICLE#1 : A FAST AND RATIO-METRIC METHOD FOR QUANTIFICATION OF CYSTEINE-BOUND PERSULFIDES BASED ON ALKYLATION AND GEL-SHIFT ASSAYS	99
CHAPITRE 4 MÉCANISME DE BIOSYNTHÈSE DES CENTRES FE-S PAR LA MACHINERIE ISC EUKARYOTE.....	115
1. MÉCANISME D'ASSEMBLAGE DES CENTRES FE-S PAR LA MACHINERIE ISC DE <i>M. MUSCULUS</i>	115
1.1 Contexte de l'étude.....	115
1.2 ARTICLE#2: Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide processing functions of ferredoxin-2 and frataxin.....	117
1.3 Résumé de l'article #2.....	143

1.3.1	Caractérisation du site de fixation du fer d'ISCU	143
1.3.2	Activités catalytiques de Fe-ISCU et Zn-ISCU	144
1.3.3	Mécanisme de formation de centre Fe-S, rôle de FDX2	146
1.3.4	Mécanisme de stimulation de l'assemblage par FXN.....	148
1.3.4.1	Vitesse globale d'assemblage des centres Fe-S.....	150
1.3.4.2	Vitesse de transfert.....	151
1.3.4.3	Vitesses de réduction	151
1.3.5	Mécanisme de formation de centres Fe-S par la voie dépendante du DTT	152
1.3.6	Discussion intermédiaire.....	153
1.4	<i>Etude des formes structurée et déstructurée d'ISCU et leur liaison au complexe NIA</i>	155
1.5	<i>Fixation de la frataxine sur le complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU</i>	157
1.6	<i>Formation du centre binucléaire [2Fe2S]</i>	158
1.6.1	Cinétique à temps court pour détecter un dimère transitoire	158
1.6.2	Rôle d'ISD11-ACP dans la dimérisation potentielle d'ISCU	160
1.7	<i>Études structurales des complexes NIAU et NIAUF</i>	161
1.7.1	Cristallisation de Fe-ISCU	162
1.7.2	Cristallisation des complexes NIAU et NIAUF avec la forme Fe-ISCU.....	163
1.7.3	Microscopie électronique du complexe NIAUF.....	164
2.	CARACTERISATION STRUCTURALE DE FE-ISCU, PRECURSEUR DE L'ASSEMBLAGE DES CENTRES FE-S.....	165
2.1	<i>Contexte de l'étude</i>	165
2.2	<i>ARTICLE#3: Iron insertion in the assembly site of ISCU scaffold proteins is a conserved process for the initiation of Fe-S cluster biosynthesis</i>	167
2.3	<i>Résumé de l'article #3</i>	206
2.3.1	Insertion du fer et effet du pH et de la nature du tampon	206
2.3.2	Localisation du centre métallique d'ISCU	208
2.3.3	Détermination du site de liaison du fer dans ISCU par spectroscopie XAS	208
2.3.4	Détermination des ligands du fer dans ISCU.....	209
2.4	<i>Effet du GSH et de la L-cystéine sur l'insertion du fer dans ISCU</i>	211
2.5	<i>Etude de la séquence d'insertion du fer et de formation du complexe NIA</i>	212
3.	DISCUSSION GENERALE.....	212
CHAPITRE 5 CARACTÉRISATION DE LA MACHINERIE ISC CHEZ <i>E. COLI</i>		220
1.	CONTEXTE DE L'ÉTUDE	220
2.	RECONSTITUTION DE LA MACHINERIE ISC D' <i>E. COLI</i>	220
2.1	<i>Mesure de zinc dans IscU</i>	220
2.2	<i>Réaction d'assemblage</i>	220
3.	INSERTION ET TITRATION DU FER DANS LA PROTEINE ECHAFAUDAGE ISCU	222
4.	ÉTUDE DE LA REACTION DE TRANSPERSULFURATION ENTRE ICS ET ISCU	224
5.	EFFET DE FDX SUR LE PERSULFURE D'ISCU	226
6.	MECANISME DE FORMATION DU CENTRE [2Fe2S]	226
6.1	<i>Recherche d'un intermédiaire [1Fe1S]</i>	227
6.2	<i>Études par réticulation protéique</i>	229
6.3	<i>Étude par spectrométrie de masse native</i>	231
7.	DISCUSSION	235
CHAPITRE 6 DÉPENDANCE EN FRATAXINE DES MACHINERIES ISC		239
1.	ROLE DE LA FRATAXINE BACTERIENNE CyaY DANS LA MACHINERIE D'ASSEMBLAGE ISC.....	239
1.1	<i>Contexte de l'étude</i>	239
1.2	<i>Effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S</i>	239
1.2.1	Effet de CyaY en conditions pauvres en fer	239
1.2.2	Effet de CyaY sur l'assemblage en conditions riches en fer	240
1.3	<i>Effet du fer et de CyaY sur la formation du persulfure d'IscS</i>	242
1.4	<i>Effet du fer et de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU</i>	243
1.4.1	Effet de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU en conditions pauvres en fer	243
1.4.2	Effet de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU en conditions riches en fer	244

1.5 Effet du fer et de CyaY sur la réduction de persulfure par Fdx	246
1.5.1 Effet de CyaY sur la réduction du persulfure d'IscU en conditions pauvres en fer	246
1.5.2 Effet du fer sur la réduction du persulfure d'IscU à 1 équivalent de L-cystéine	247
1.5.3 Effet du fer sur la réduction du persulfure d'IscU à 2 équivalents de L-cystéine	249
1.6 Effet du fer sur le complexe IscS-IscU	251
1.7 Assemblage en conditions stœchiométriques en présence d'un excès de fer.....	254
1.8 Effet de CyaY sur la distribution du persulfure d'IscS.....	254
1.8.1 Effet de TusA.....	255
1.8.2 Effet d'IscX	257
2. UNE COEVOLUTION ENTRE ISCU ET LA FXN A PERMIS DE RENDRE LA MACHINERIE ISC EUARYOTE DEPENDANTE DE LA FXN.	259
2.1 Contexte de l'étude.....	259
2.2 Effet de la mutation d'IscU M106I sur la machinerie ISC eucaryote	260
2.3 Effet de la mutation d'IscU I106M sur la machinerie ISC procaryote	261
2.4 Effet de CyaY sur la machinerie ISC eucaryote	263
3. DISCUSSION	265
CHAPITRE 7 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	269
BIBLIOGRAPHIE	274
ANNEXE 1 LE DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	299
ANNEXE 2 LA SPECTROSCOPIE MÖSSBAUER.....	301
ANNEXE 3 LA SPECTROSCOPIE RMN.....	303
ANNEXE 4 LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	306
ANNEXE 5 LA SPECTROSCOPIE DE RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE (RPE)	307
ANNEXE 6 REVUE: MECHANISM OF IRON–SULFUR CLUSTER ASSEMBLY: IN THE INTIMACY OF IRON AND SULFUR ENCOUNTER.....	309

Liste des abréviations

Liste des abréviations

2,5-DHBA - 2,5-dihydroxy benzoic acid

4'-PP - 4'-phosphopantéthéine

5'-dAdo• - Radical 5'-deoxyadenosyl

²H₂O - Deutérium

°C - Degré Celsius

ABCB7 - ATP binding cassette B7

AcONH₄ - Acétate d'ammonium

ADN - Acide désoxyribonucléique

ADP - Adénosine diphosphate

ALAS2 - Delta-aminolevulinate synthase 2

ARBS - Alkylation-reduction band shift

ARN - Acide ribonucléique

ARNm - Acide ribonucléique messenger

ARNt - Acide ribonucléique de transfert

ATP - Adénosine triphosphate

BDH2 - 3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2

Bfr - Bactéroferritine

BLI - Biolayer interferometry

CD - Circular dichroism

CD - Cystéine désulfurase

CFD1 - Cytosolic Fe-S cluster deficient

CIA - Cytosolic iron-sulfur cluster assembly

CSD - Cysteine sulfinase desulfinase

Cul1 - Cullin1

Da - Dalton

DMT1 - Divalent metal transporter 1

DO - Densité optique

Dps - DNA protection during starvation protein

DSS - Acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique

DTPA - Acide diéthylène triamine penta acétique

DTT - Dithiothréitol

EDTA - Acide éthylène diamine tétra-acétique

Liste des abréviations

FAD - Flavine adénine dinucléotide

FBXL5 - F-box and leucine-rich repeat protein 5

FECH - Ferrochélatase

Feo - Ferrous iron transport

Fe-S - Centres fer-soufre

FMN - Flavine mononucléotide

FPN - Ferroportine

FTH1 - Ferritin heavy chain 1

FTL - Ferritin light chain

FUR - Ferric uptake regulator

Grx - Glutaredoxine

GSH - Glutathion

GTP - Guanosine triphosphate

H₂O₂ - Peroxide d'hydrogène

H₂S - Sulfure d'hydrogène

HCP1 - Haem carrier protein 1

HiPiPs - High potential iron sulfur proteins

HO-1 - Hème oxygénase 1

HSQC - Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy

ICP-MS - Spectrométrie de masse couple à un plasma inductif

IPTG - Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

IRE - Iron responsive element

IRP1/2 - Iron regulatory protein 1/2

ISC - Iron sulfur cluster

ITC - Isothermal titration calorimetry

LB - Lysogeny broth

LIP - Labile iron pool

LMCT - Ligand to metal charge transfer

LUCA - Last universal common ancestor

LysR - Transcriptional activator protein LysR

M9 - Minimal medium

MMDS - Multiple mitochondrial dysfunction syndrome

MS - Spectrométrie de masse

Mfrn1/2 - Mitoferrin 1/2

Liste des abréviations

MPP - Mitochondrial processing peptidase
mtFAS - Mitochondrial fatty acid synthesis
NAD⁺ - Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBP35 - Nucleotide binding protein 35 kDa
NCOA4 - Nuclear receptor co-activator 4
NIA - NFS1-ISD11-ACP
NIAU - NFS1-ISD11-ACP-ISCU
NIAUF - NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN
NIF - Nitrogen fixation
NIUF - NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN
NRAMP2 - Natural resistance-associated macrophage protein 2
NTBI - Non transferrin bound iron
PAR - 2-(4-pyridylazo)resorcinol
PCBP1 - poly (rC)-binding protein 1
PCD - Polarisée circulairement à droite
PCG - Polarisée circulairement à gauche
PDB - Protein data bank
pH - Potentiel hydrogène
PLP - Phosphate de pyridoxal
ppm - Parties par millions
radical-SAM - Radical S-adénosyl méthionine
Rbx1 - Ring-box1
RMN - Résonance magnétique nucléaire
ROS - Reactive oxygen species
RPE - Résonance paramagnétique électronique
Rpm - Rotation par minute
SAXS - Small angle X-ray scattering
SBD - Substart binding domain
SDS - Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH3 - SRC homology 3 domain
SOC - Super optimal broth

Liste des abréviations

SPK1 - S-phase kinase-associated protein 1

STEAP3 - Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3

SUF - Sulfur mobilization

Tf - Transferrine

TfR1 - Transferrin receptor 1

TFIIH - Transcription factor II human

UTR - Untranslated region

UV - Ultrat-violet

WT- Wild type

XPD - Xeroderma pigmentosum group D complementing protein

ZIP14 - Zinc transporter protein 14

Liste des figures

Figure 1 Distribution du fer dans le corps humain	16
Figure 2 Absorption et utilisation du fer par le duodénum	18
Figure 3 Acquisition du fer cellulaire	20
Figure 4 Distribution des différentes protéines contenant du fer au sein des organelles d'une cellule	20
Figure 5 Acquisition du fer chez <i>E. coli</i> par les sidérophores	24
Figure 6 Acquisition du fer chez <i>E. coli</i> par le système FEO	26
Figure 7 Régulation du fer cellulaire par les protéines IRP1 et IRP2	28
Figure 8 Régulation du fer et des centres Fe-S chez <i>E. coli</i>	31
Figure 9 Les différentes structures des centres Fe-S	34
Figure 10 Le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire	35
Figure 11 Le fonctionnement des enzymes radical S- adénosyl méthionine (SAM)	36
Figure 12 Diversité de réactions réalisées par les enzymes radical S- adénosyl méthionine (SAM)	37
Figure 13 Mode d'action de l'aconitase	38
Figure 14 Modèle de détection de dommage à l'ADN par l'hélicase XPD	39
Figure 15 Biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes	43
Figure 16 Modèle du principe d'assemblage des centres Fe-S	44
Figure 17 Structure des différentes ISCU complexées par un centre [2Fe2S]	47
Figure 18 Structure de la protéine échafaudage ISCU liant un atome de zinc de deux organismes différents	48
Figure 19 Structure de la protéine échafaudage ISCU sous différents états de repliement.	49
Figure 20 Mécanisme de formation du persulfure sur les CD	51
Figure 21 Structure des différentes conformations de la CD humaine NFS1-ISD11-ACP.	53
Figure 22 Structure de Fdx d' <i>E. coli</i> et de FDX2 humaine.	56
Figure 23 Structure de la frataxine et des protéines similaires structurellement de la frataxine.	59
Figure 24 Représentation des résidus conservés de la frataxine.	60
Figure 25 Zone d'interaction des chaperonnes HSPA9 et HSC20 avec ISCU	61
Figure 26 Modèle chaperonnes dépendant du transfert du centre Fe-S vers les protéines cibles	62
Figure 27 Structure du complexe de la machinerie ISC	68
Figure 28 Modèle et structure des complexes de la machinerie ISC en présence de la frataxine	71
Figure 29 Schéma explicatif de l'activité CD de NFS1	73
Figure 30 Carte des plasmides utilisés pour la surexpression des protéines de la machinerie ISC de <i>M. musculus</i>	76
Figure 31 Test d'expression du complexe NIA.	88
Figure 32 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel du complexe NFS1-ISD11-ACP _E	89
Figure 33 Chromatographie d'exclusion de taille du complexe NFS1-ISD11-ACP _{Ec}	90
Figure 34 Caractérisation de ACP _{Mm} et ACP _{Hs}	91
Figure 35 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel d'ISCU	93
Figure 36 Chromatographie d'exclusion de taille d'ISCU.	94
Figure 37 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la FXN.	95
Figure 38 Chromatographie d'exclusion de taille de la FXN.	95
Figure 39 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la FDX2	96
Figure 40 Chromatographie d'exclusion de taille de la FDX2.	97
Figure 41 Principe de la méthode d'alkylation pour visualiser et quantifier les persulfures	98
Figure 42 Insertion du fer dans apoISCU ou Zn-ISCU	143
Figure 43 Méthode utilisée pour suivre la formation des centres Fe-S en conditions catalytiques avec Fe-ISCU ou Zn-ISCU.	145
Figure 44 Transfert de persulfure métal-dépendant entre NFS1 et ISCU	147

Liste des figures

Figure 45 Réduction du persulfure d'ISCU par le couple FDX2/FDXR.....	147
Figure 46 Schéma réactionnel d'assemblage.	149
Figure 47 Schéma illustrant le transfert de persulfure associé à la constante de vitesse k_t	151
Figure 48 Schéma illustrant la réaction de réduction associée à la constante de vitesse k_{obs}	151
Figure 49 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par la voie thiol-dépendante	153
Figure 50 Modèle du mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par la voie FDX2-dépendante chez les eucaryotes.....	154
Figure 51 Spectre RMN 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC.....	156
Figure 52 Formation du complexe NIAUF	157
Figure 53 Détermination du K_d de la FXN pour le complexe NIAU	158
Figure 54 Caractérisation spectroscopique d'un dimère d'ISCU.....	159
Figure 55 Caractérisation d'une NFS1 sans ISD11-ACP	161
Figure 56 Caractérisation du complexe NIAUF par microscopie électronique.....	165
Figure 57 Effet du tampon sur l'insertion du fer par spectroscopie Mössbauer	207
Figure 58 Effet du GSH et de la L-cystéine sur l'insertion du fer dans ISCU.....	211
Figure 59 Effet de la séquence d'insertion du fer sur l'assemblage des centres Fe-S.	212
Figure 60 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par les voies FDX2- et thiol-dépendante.....	213
Figure 61 Différentes voies de formation de l'état intermédiaire 1 initiant la formation de l'assemblage des centres Fe-S.....	215
Figure 62 Réarrangement de l'atome de zinc d'ISCU en présence de NFS1 et de la FXN.	216
Figure 63 Modèle du transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU.....	217
Figure 64 Reconstitution de centres Fe-S par la machinerie ISC d'E.coli.....	222
Figure 65 Caractérisation de la forme Fe-IscU.....	223
Figure 66 Persulfidation d'IscS et transfert du persulfure vers IscU.....	225
Figure 67 Réduction du persulfure d'IscU par Fdx.....	226
Figure 68 Mécanisme de formation d'un centre [2Fe2S].....	227
Figure 69 Mécanisme de formation d'un centre [2Fe2S].....	229
Figure 70 Étude par réticulation protéique afin de mettre en évidence une dimérisation d'ISCU.	230
Figure 71 Résistance du centre binucléaire [2Fe2S].....	231
Figure 72 Mise en évidence de la formation d'un dimère d'IscU.....	232
Figure 73 Zoom des spectres de spectrométrie de masse native sur un état de charge correspondant à un monomère et à un dimère.	233
Figure 74 Zoom des spectres de spectrométrie de masse native sur un état de charge correspondant à un monomère et à un dimère.....	234
Figure 75 Mécanisme de dimérisation pour former le centre [2Fe2S]	235
Figure 76 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC procaryote	236
Figure 77 Structure cristallographique du dimère d'IscU de <i>M. thermoacetophila</i> liant deux [2Fe2S].....	237
Figure 78 Effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S.....	240
Figure 79 Effet d'un excès de fer sur l'assemblage des centres Fe-S.....	242
Figure 80 Formation du persulfure d'IscS en fonction d'apo-IscU, de CyaY et du fer.....	243
Figure 81 Effet de CyaY sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU	244
Figure 82 Effet du fer dans le milieu réactionnel et de CyaY sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU.....	246
Figure 83 Effet de CyaY sur la réduction du persulfure de Fe-IscU	247
Figure 84 Effet du fer sur la réduction du persulfure de Fe-IscU à 1 équivalent de L-cystéine	249
Figure 85 Effet du fer sur la réduction du persulfure de Fe-IscU à 2 équivalents de L-cystéine	251
Figure 86 Effet du fer sur la formation du complexe IscS-IscU-Fdx.....	254

Liste des figures

Figure 87 Modèle des zones d'interaction entre le dimère d'IscS et ces partenaires IscU, TusA, ThiI, CyaY et IscX.....	255
Figure 88 Compétition de transfert du persulfure d'IscS vers Fe-IscU ou TusA.....	256
Figure 89 Compétition de transfert du persulfure d'IscS vers Fe-IscU ou TusA C19S et TusA C56A	257
Figure 90 Effet de IscX sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU et TusA.....	258
Figure 91 Effet du mutant ISCUM106I sur l'assemblage des centres Fe-S.....	261
Figure 92 Effet du mutant IscU I106M sur le transfert de persulfure.....	262
Figure 93 Effet du mutant IscU I106M sur l'assemblage des centres Fe-S.....	263
Figure 94 Effet de CyaY sur l'assemblages des centres Fe-S par la machinerie eucaryote.....	264
Figure 95 Interaction de la FXN avec ISCU	268
Figure 96 Schéma du diagramme des orbitales moléculaires entre le métal Fe ²⁺ et un ligand cystéine	Erreur ! Signet non défini.
Figure 97 Représentation du déplacement chimique et de l'écart quadrupolaire durant une expérience de mössbauer	302
Figure 98 Représentation d'une expérience de spectroscopie RMN 1D.....	304
Figure 99 Orientation des électrons sous l'action d'un champ magnétique externe B ₀	307
Figure 100 Induction des énergies des états de spin en fonction du champ magnétique B ₀	308

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 Nom des différentes protéines de la machinerie ISC et facteurs additionnels pouvant s'y associer chez les procaryotes, levures et mammifères.	45
Tableau 2 Tableau récapitulatif des protéines et de leurs vecteurs utilisés durant ma thèse.....	78
Tableau 3 Tableau récapitulatif des masses attendues pour ACP _{Ecs} , ACP _{Mm} et ACP _{Hs}	92
Tableau 4 Tableau récapitulatif des masses expérimentales obtenues par spectrométrie de masse native.	92
Tableau 5 Récapitulatif des conditions de cristallisation testées pour Fe-ISCU.	162
Tableau 6 Récapitulatif des conditions de cristallisation testées pour le complexe NIAU et NIAUF.	163
Tableau 7 Tableau récapitulatif des masses des différentes espèces obtenues par spectrométrie de masse native.	233

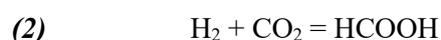
Préambule

Préambule

L'un des processus fondamentaux ayant permis l'apparition de la vie est la capacité des premiers organismes vivants à utiliser l'énergie présente sous forme thermique et chimique. Mais comment ces énergies ont-elles pu être mobilisées pour constituer le métabolisme cellulaire à la base de la synthèse des premières molécules organiques complexes ? Pour cela il faut remonter à l'état de la Terre il y a quelque 4 à 3.5 milliards d'années lorsque les premières formes de vie sont apparues. La surface de la Terre était principalement constituée d'eau (H₂O), d'ammoniaque (NH₃), de diazote (N₂), de dioxyde de carbone (CO₂), de méthane (CH₄), de sulfure d'hydrogène (H₂S) et d'un grand nombre de métaux, principalement du fer présent sous forme de pyrite (Fe-S₂) (Rees & Howard, 2003).

Le mécanisme fondateur de l'apparition de la vie sur Terre est encore très controversé et sujet à débat. Cependant une hypothèse met en avant le rôle du fer et du soufre comme étant à l'origine des premières réactions ayant permis la production de molécules complexes à partir de ces molécules primordiales. Il y a 4 milliards d'années, des fissures au fond de la mer sont apparues : les sources hydrothermales, de 500 à 5000 mètres de profondeur. Ces sources hydrothermales sont apparues près des zones volcaniques actives, là où les plaques tectoniques divergent ou encore près des bassins océaniques et des points chauds. Dans ces crevasses, l'eau froide s'engouffre jusqu'à plusieurs centaines de mètres de profondeur et va rencontrer des zones chaudes (>400°C) en raison de la présence de magma à proximité. L'eau chauffée devient moins dense et remonte en direction de la surface où elle va jaillir au travers de structures nommées fumeurs. On peut distinguer deux types de fumeurs différents : les fumeurs blancs qui rejettent de l'eau entre 150-200°C et où la couleur blanche est due à la précipitation de sulfure de calcium et les fumeurs noirs qui rejettent de l'eau à plus de 350°C et contenant, entre autres, du fer et du soufre leur procurant cette couleur noire.

Les fumeurs noirs sont caractérisés par un environnement acide (pH 2-3) et des conditions anaérobies avec une forte concentration en CO₂ (4-215 mm/kg), H₂S (3-110 mmol/kg), H₂ (0,1-50 mmol/kg) et en métaux de transition, notamment en fer qui est l'un des métaux les plus abondants dans ces cheminées (Olson and Straub 2015). Le soufre et le fer présents dans les fumeurs noirs réagissent ensemble pour former du sulfure de fer (Fe-S). Le sulfure de fer va alors pouvoir réagir avec H₂S pour réduire les ions hydronium (H⁺) en dihydrogène (H₂) et former de la pyrite de fer (Fe-S₂) (**réaction 1**). H₂ est également capable de réduire le dioxyde de carbone (CO₂) en acide formique (HCOOH) (**réaction 2**) et le diazote (N₂) en ammoniaque (NH₃) (**réaction 3**) (McCollom & Seewald, 2007).



Préambule

Le sulfure de fer (Fe-S) pourrait donc être à l'origine de la production de ces molécules et d'autres plus complexes. Ces réactions sont retrouvées chez un grand nombre d'organismes vivants qui utilisent des enzymes à centres Fe-S pour catalyser les transformations redox du N₂, du monoxyde de carbone CO et du dihydrogène H₂ (Rees & Howard, 2003). La remarquable similitude entre le fonctionnement des minéraux spontanément formés au sein des fumeurs noirs et des enzymes à centres Fe-S retrouvées chez les organismes vivants est un argument fort pour appuyer l'hypothèse que les centres Fe-S sont à l'origine de la vie. Pour certains scientifiques, le fer et le soufre ont été d'une importance primordiale pour catalyser la formation des acides aminés et leur assemblage en peptides (Huber and Wächtershäuser, 1998). Les enzymes contenant des centres Fe-S sont à ce jour les plus anciennes métalloprotéines connues (Boyd & al, 2014). Les organismes vivants issus des trois domaines du vivant : archées, bactéries et eucaryotes, utilisent encore aujourd'hui les formidables capacités des centres Fe-S. Il en existe de plusieurs types notamment les centres [2Fe2S] et [4Fe4S] qui sont les plus répandus.

Mon projet de thèse a été l'étude des mécanismes de biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes et les procaryotes. L'une des questions principales a été de comprendre comment sont orchestrés les processus d'insertion du fer et du soufre pour permettre l'assemblage de ces structures poly-atomiques de manière contrôlée. La biosynthèse des centres Fe-S nécessitant une source de fer, je vais dans un premier temps commencer par présenter les voies d'acquisition du fer chez les eucaryotes supérieurs puis chez les bactéries en prenant *E. coli* comme modèle. Dans un second temps, je présenterai le rôle des protéines à centres Fe-S, les principes de base de leur biosynthèse ainsi que les maladies associées.

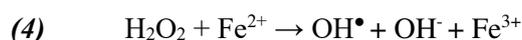
Chapitre 1 Introduction bibliographique

1. Homéostasie du Fer

1.1 Homéostasie du fer chez les eucaryotes

Le fer est l'un des éléments les plus utilisés par les organismes vivants. Les deux raisons principales sont que c'est l'un des éléments les plus abondants sur Terre et qu'il présente des propriétés physico-chimiques très variées. Le fer existe sous différents états d'oxydation, les plus stables étant les états ferreux (+II) et ferriques (+III) (à noter que les chiffres romains sont utilisés pour décrire l'état d'oxydation d'un métal lorsque celui-ci est dans un site catalytique d'enzymes et que les chiffres 2+, 3+... sont utilisés pour décrire la charge des ions « libres » en solution). Mais au sein de sites actifs d'enzymes des états +I, +IV et même +V peuvent être obtenus qui sont extrêmement réactifs et permettent de catalyser un plus grand nombre encore de réactions. Grâce à ces différents états redox le potentiel redox du fer s'étend de -300 à + 700 mV, soit la quasi-totalité des potentiels redox accessibles en solution aqueuse qui sont limités par la réduction et l'oxydation de l'eau, soit de -400 à + 800 mV. Cette gamme de potentiels redox accessibles est beaucoup plus large que n'importe quel autre métal. De plus, le fer se présente sous différentes formes au sein des enzymes, soit complexé par une porphyrine (un macrocycle poly-pyrrolique) sous forme d'hème, soit associé à des ions sulfures sous forme de centre fer-soufre, soit directement lié à l'enzyme sous forme dite non-hème, ce qui diversifie d'autant ses possibilités réactionnelles. Le fer s'est vite rendu indispensable pour les organismes vivants notamment dans le transport de l'oxygène, la respiration mitochondriale, la synthèse d'une grande variété de métabolites, la signalisation cellulaire ou encore la synthèse d'ADN et de protéines.

Chez les eucaryotes, l'homéostasie du fer est très finement régulée au niveau systémique et cellulaire car un défaut ou un excès de fer peut engendrer de nombreuses pathologies. La carence en fer est l'une des premières causes d'anémie (diminution des globules rouges) et représente un problème de santé mondiale (Camaschella, 2015). À l'inverse, un excès de fer peut se révéler toxique, car la capacité du fer à alterner entre une forme réduite Fe^{2+} et oxydée Fe^{3+} , permet la formation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS en anglais pour **R**eactive **O**xygen **S**pecies) via la réaction de Fenton conduisant à un stress oxydatif par la formation de radicaux hydroxyles pouvant induire des voies de signalisation déterminantes dans la survie et la mort cellulaire (**réaction 4**) (D'autréaux et Toledano, 2007).



Introduction bibliographique

1.1.1 Métabolisme systémique du fer

1.1.1.1 Répartition du fer dans le corps

Le corps d'un humain contient environ 3 à 5 g de fer répartis dans différents tissus (**Figure 1**) (Wang & Pantopoulos, 2011). La plupart du fer (70 %) se trouve sous forme d'hème (appelé aussi héminique) dans l'hémoglobine des cellules érythroïdes (2 à 3 g) et dans la myoglobine des muscles (300 mg). Le fer héminique des globules rouges sénescents est recyclé par des macrophages au niveau de la rate, du foie et de la moelle osseuse. Environ 30 mg de fer sont recyclés quotidiennement. L'excès de fer est principalement stocké dans le parenchyme hépatique (1 g, 20 %) au sein d'une protéine de stockage appelée ferritine. Au niveau cellulaire, la quantité de fer requise pour toutes les protéines et enzymes, notamment Fe-S serait de l'ordre de 8 mg. La quantité moyenne de fer circulant dans le plasma permettant d'apporter le fer aux cellules, est infime, de l'ordre de 3 à 4 mg, car nous le verrons par la suite sa concentration est fortement régulée. On estime les pertes quotidiennes en fer de l'ordre de 1 à 2 mg par jour par desquamation (Wang & Pantopoulos, 2011). Plusieurs mg par jour sont également perdus en cas de saignement ou chez les femmes en période de menstruation. L'apport nutritionnel quotidien permet de compenser ces pertes par absorption de fer au niveau du duodénum.

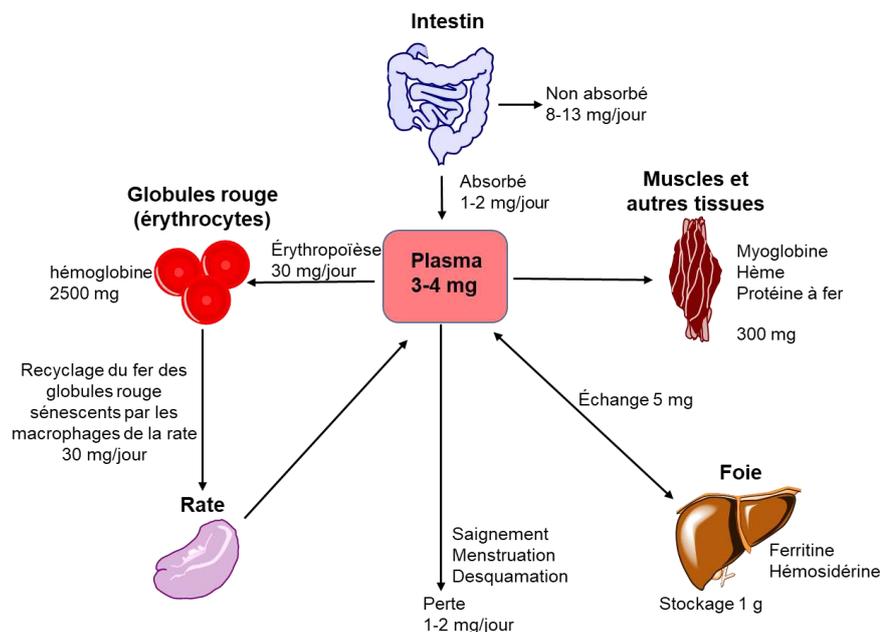


Figure 1 Distribution du fer dans le corps humain (inspiré de Pantopoulos & al, 2012)

1.1.1.2 Absorption du fer au niveau du duodénum

Lors de la prise d'un repas, le fer est absorbé dans le duodénum au niveau des entérocytes. Les entérocytes sont des cellules de l'épithélium intestinal constitués de microvillosités qui permettent un élargissement de la surface pour améliorer l'absorption des nutriments. Le fer alimentaire est assimilé

Introduction bibliographique

sous deux formes différentes qui sont le fer héminique et non héminique. Le fer héminique provient principalement de la dégradation de l'hémoglobine et de la myoglobine de la viande rouge. La solubilité du fer héminique ainsi que la présence de récepteurs spécifiques HCP1 (West & Oates, 2008) facilitent l'acquisition de ce fer (**Figure 2**). Le fer héminique est par la suite libéré dans le cytosol des entérocytes via la dégradation de l'hème par l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Ryter & al, 2006). Le fer non héminique est principalement fourni par l'absorption de légumes. Cependant, ce fer non héminique est très peu soluble car principalement présent sous forme oxydée Fe^{3+} , ce qui complique son acquisition par le duodénum. Néanmoins, l'organisme a su s'adapter afin d'améliorer la solubilité de ce fer ferrique. En effet, la solubilité du fer ferrique est pH dépendante passant de 10^{-18} à pH 7,0 à 10^{-3} à pH 2,0 (Dlouhy & Outten, 2013). L'organisme a donc mis en place une stratégie d'acidification dirigée par l'estomac permettant d'acidifier les entérocytes pour une meilleure absorption. Ce fer inorganique est premièrement réduit en Fe^{2+} par l'ascorbate et par des ferriréductases comme le cytochrome b duodéal ce qui le rend d'autant plus soluble (Fe^{2+} étant soluble entre pH 0 et 7,0) (**Figure 2**) (McKie, 2008). Une fois réduit, le Fe^{2+} est transporté à travers la membrane apicale des entérocytes par le transporteur des métaux divalent n°1 (DMT1) (Hentze & al, 2010). Le fer intracellulaire, sous forme d'ions Fe^{2+} est ensuite exporté par la membrane basolatérale des entérocytes par le transporteur transmembranaire ferroportine (FPN) vers le sang. Ces ions Fe^{2+} sont immédiatement oxydés en ions Fe^{3+} par l'héphaestine, une ferroxidase cuivre-dépendante ou par son homologue plasmatique la céruloplasmine pour être pris en charge par la transferrine (Tf) (Hentze & al, 2010). Cette oxydation est nécessaire pour le transport dans le plasma par la Tf qui lie uniquement le fer sous forme ferrique Fe^{3+} . L'affinité de Tf pour le Fe^{3+} est très forte avec un K_D de l'ordre de 10^{-23} à pH 7,4 (à noter que contrairement à ce qui est habituellement trouvé dans la littérature, une constante d'équilibre est une grandeur sans unité) permettant ainsi de séquestrer le fer plasmatique pour faciliter sa distribution aux différents tissus périphériques (Gkouvatsos & al, 2012). Lorsque la Tf est saturée en fer, le fer peut circuler sous une forme non liée à la transferrine (NTBI) mais les transporteurs de ce fer ne sont pas clairement identifiés (Brissot & al, 2012). Il semble que ce fer soit lié à des composés de faible poids moléculaire. Des petits chélateurs de fer avec une affinité inférieure à celle de Tf ont été proposées comme la lipocalin 24p3 (Yang & al, 2002). L'excès de fer dans le plasma est absorbé et stocké dans les hépatocytes par la ferritine (**Figure2**).

1.1.1.3 Utilisation du fer

Le fer circulant (lié à la Tf et NTBI) est absorbé par les muscles et les autres tissus pour être incorporés aux enzymes à fer sous forme non-hème, hème et centre Fe-S. Une très grande partie du fer est absorbée par la moelle osseuse afin de réaliser l'érythropoïèse, le processus de génération des globules rouges. Les globules rouges sénescents vont être phagocytés par les macrophages permettant

Introduction bibliographique

ainsi le recyclage des hèmes en les dégradant par HO-1. Les ions Fe^{2+} sont par la suite exportés à travers le transporteur FPN où une oxydation a lieu par la céruloplasmine afin de pouvoir se lier à nouveau à la Tf (Figure 2).

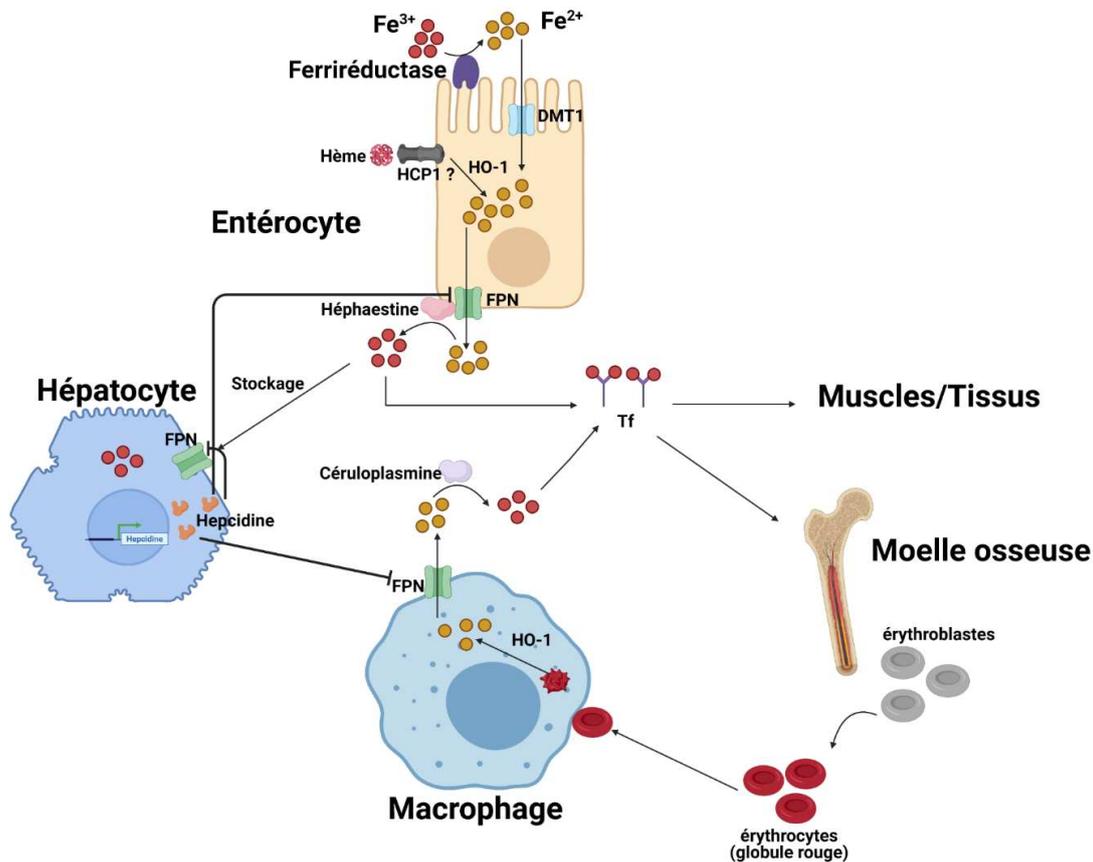


Figure 2 Absorption et utilisation du fer par le duodénum. Le fer alimentaire est réduit en fer ferreux puis absorbé par le transporteur DMT1 à la surface des entérocytes tapissant le duodénum. Le fer est exporté par la ferroportine (FPN) puis va être oxydé par l'héphaestine pour être transporté par la transferrine. Le fer est par la suite utilisé par (1) les muscles/tissus ; (2) la moelle osseuse pour former les globules rouges ; (3) les macrophages afin de recycler les globules rouges sénescents ; (4) les hépatocytes pour être stocké au sein de la ferritine. (Inspiré de Pantapoulos & al, 2012)

1.1.2 Métabolisme du fer intracellulaire

1.1.2.1 Acquisition du fer cellulaire

La membrane cellulaire empêche le libre passage du fer. Les cellules ont donc développé différents mécanismes afin d'acquérir du fer (Figure 4). La Tf chargée en fer va se lier au récepteur TfR1, une glycoprotéine transmembranaire formant un homodimère de 180 kDa capable de lier une Tf par sous-unité (Aisen, 2004). Le complexe $2x(\text{Fe}^{3+}\text{-Tf})\text{-TfR1}$ est internalisé par endocytose clathrine-

Introduction bibliographique

dépendante. L'environnement acide des endosomes permet alors de protoner les ligands du fer ferrique de la Tf afin de rendre le fer labile pour sa libération du complexe (Bali & al, 1991). Le Fe^{3+} est par la suite réduit en Fe^{2+} par la métalloréductase STEAP3 pour pouvoir être transporté à travers la membrane de l'endosome par le transporteur DMT1 aussi connu sous le nom NRAMP2 (Ohgami & al, 2006 ; Fleming & al, 1997). Le complexe 2x(apo-Tf)-TfR1 est recyclé vers la surface de la cellule. Le fer circulant NTBI est absorbé via un transporteur membranaire DMT1 (Collins & al, 2005). Le transporteur de métaux ZIP14 a également été proposé pour le transport du NTBI (Liuzzi & al, 2006). Le fer transporté dans le cytoplasme est ensuite distribué dans les différents compartiments cellulaires en transitant par un ensemble d'états mal définis appelés « pool » de fer libre ou LIP (**L**abile **I**ron **P**ool). Ce LIP représenterait 0,2 à 5 % du fer intracellulaire (Petrat & al, 2001) et permettrait une liaison coordonnée entre l'acquisition du fer et son utilisation, stockage ou export (Kruszewski, 2003). Le potentiel réducteur du cytosol dû à la forte concentration en glutathion (GSH), un tripeptide de formule γ -L-Glutamyl-L-cystéinyl-glycine, favoriserait la réduction des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} au sein de ce LIP. Des études récentes par spectrométrie Mössbauer (voir annexe pour une description de la technique) et par des mesures avec des sondes fluorescentes ont confirmé que ce LIP n'est constitué quasiment que par du fer ferreux Fe^{2+} (Chakrabarti & al, 2015 ; Aron & al, 2016). Les petites molécules capables de chélater le fer à pH 7,0 ont rapidement été proposées comme ligands du LIP dont certains acides aminés, l'ATP/ADP et les inositols phosphate (Veiga & al, 2009 ; Weaver & Pollack, 1989). Cependant, ces molécules ne sont pas capables de former des complexes stables avec du fer ferreux Fe^{2+} . Le citrate par contre est capable de former un complexe avec le Fe^{2+} à un pH compris entre 6,0 – 8,0 avec un K_D de l'ordre de 10^{-3} . Il a donc été proposé que le citrate soit l'un des ligands principaux du Fe^{2+} au sein du LIP. Cependant, le Fe^{2+} complexé par le citrate est facilement oxydable, ce qui suggère la présence d'autres molécules afin de maintenir le fer sous forme réduite (Hider & Kong, 2011). Les petites molécules porteuses de groupement thiols comme le glutathion (GSH) ou la L-cystéine ayant une forte affinité pour le Fe^{2+} ($K_D = 10^{-6}$) ont été proposées comme ligand du LIP (Hider & Kong, 2011). La concentration cellulaire en GSH *in vivo* chez les eucaryotes est estimée entre 5 et 15 mM, et jusqu'à 30 mM ont été mesuré au sein de la levure, ce qui est bien supérieur aux concentrations *in vivo* de la L-cystéine (0,1 mM) et du citrate (0,4 – 1,2 mM) (Montero & al, 2013 ; Ponsero & al, 2017). Le GSH et le fer peuvent former des complexes de stœchiométrie 1:1, GSH- Fe^{2+} , à des pH compris entre 6,0 et 8,0 ; l'incubation de 1 μM Fe^{2+} avec 2 mM de GSH permet ainsi de complexer quasiment 100 % du Fe^{2+} à pH 8,0 (Hider & Kong, 2011). La formation de ce complexe limite l'oxydation du fer par une réduction rapide de celui-ci par l'excès de GSH dans le cytosol conduisant à la formation de GSSG qui peut être réduit par des réductases NADPH dépendante (glutathion réductase). Les LIP sont retrouvés dans d'autres compartiments cellulaires comme dans la vacuole ou la mitochondrie permettant ainsi de rapidement mobiliser du fer en cas de besoin (Rauen & al, 2007).

Introduction bibliographique

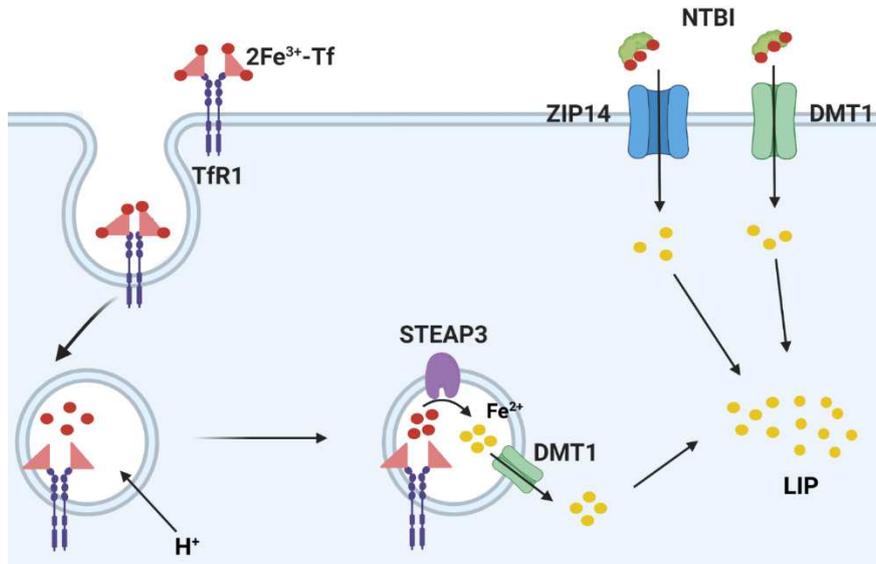


Figure 3 Acquisition du fer cellulaire. Le complexe $2x(\text{Fe}^{3+}\text{-Tf})\text{-TfR1}$ est internalisé par endocytose. L'acidité des endosomes libère le fer qui est par la suite réduit par STEAP3. Ce fer est transporté vers le cytoplasme par DMT1 et se regroupe pour former le LIP. Les transporteurs ZIP14 et DMT1 sont aussi capables de transporter le fer présent sur les NTBI vers le LIP. (Inspiré de Muckenthaler & al, 2017)

1.1.2.2 Distribution du fer cellulaire dans les organelles

On estime qu'environ 2 % des gènes chez les humains codent pour des protéines capables de lier du fer, majoritairement sous formes héminiques (48%) et non-héminiques mono ou di-nucléaire (35 %) et sous forme Fe-S (17%) (Andreini & al, 2018). Les protéines à centre Fe-S sont essentiellement présentes dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau, les protéines héminiques dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie et les protéines à fer non-hème dans le noyau et le cytoplasme (**Figure 4**). Nous allons voir que la mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme du fer intracellulaire car c'est le siège de la biosynthèse des hèmes et des centres Fe-S.

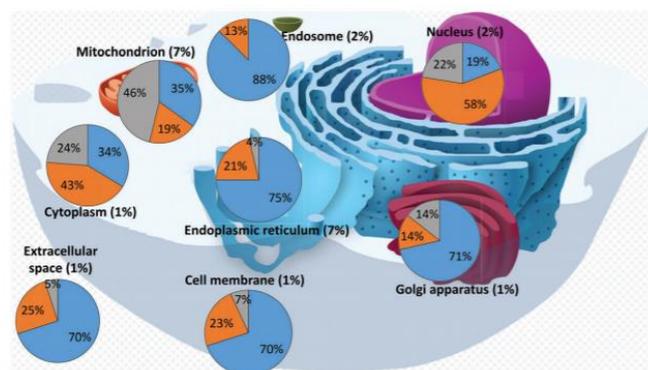


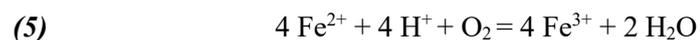
Figure 4 Distribution des différentes protéines contenant du fer au sein des organelles d'une cellule. Le pourcentage entre parenthèses représente le nombre de protéines liant du fer par rapport au nombre de protéines totales localisées dans le compartiment. Les protéines héminiques sont en bleu, les

Introduction bibliographique

protéines à centre Fe-S en gris et les protéines à fer mono-di nucléaire en orange. (Issue de Andreini & al, 2018)

1.1.2.3 Stockage du fer

Une partie importante du fer est stockée au sein de la ferritine. La ferritine présente une structure sphérique formant une large cavité au centre de la protéine permettant de lier jusqu'à 4500 atomes de fer (Arosio & al, 2009). En stockant le fer en excès, la ferritine prévient la formation de ROS et jouerait donc un rôle d'antioxydant (Epsztejn & al, 1999). Il existe également une ferritine mitochondriale (Ftmt) mais dont l'expression semble restreinte à quelques types de tissus (Santambrogio & al, 2007). La ferritine est un hétérocomplexe de 24 sous-unités constitué d'un ratio variable de deux types de sous-unités différentes: une sous-unité dite lourde, nommée FTH1, et une sous-unité dite légère, nommée FTL (Arosio & al, 2009). La sous-unité FTH1 possède une activité ferroxidase permettant l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par l'oxygène qui est une étape obligatoire afin de stocker le fer dans sa cavité (**réaction 5**). La sous-unité FTL contrôle la nucléation du fer sous forme de centre poly-nucléaire et permet le renouvellement de l'activité ferroxidase de la sous-unité FTH1 (Pantopoulos & al, 2012). Le ratio entre ces deux sous-unités varie selon le tissu où est présente la ferritine. Dans le foie, qui est le principal organe stockant le fer, il y a environ 90 % de sous-unité légère FTL (Hider & Kong, 2013). À l'inverse, dans le cœur, la sous-unité lourde est favorisée afin de limiter la formation de ROS par un excès de Fe^{2+} (Hider & Kong, 2013).



L'insertion du fer dans la ferritine et sa mobilisation en cas de carence, sont deux processus distincts, réalisés par des protéines différentes. Plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence l'implication d'une chaperonne cytosolique à fer PCBP1 qui apporterait le fer à la ferritine (Shi & al, 2008). En effet, la déplétion de PCBP1 dans des cellules humaines inhibe l'insertion de fer au sein de la ferritine et augmente la quantité de fer présent dans le LIP. La mobilisation du fer de la ferritine est effectuée par un mécanisme de dégradation de la protéine dénommé « ferritinophagie ». En condition basale ou en carence de fer, le co-activateur de récepteur 4 (NCOA4) se lie à la ferritine et enclenche le mécanisme de dégradation en envoyant la ferritine vers un phagophore (Santana-codina & Mancias, 2018). Le phagophore fusionne ensuite avec des lysosomes afin de dégrader la ferritine pour libérer les atomes de fer qui sont alors exportés vers le cytosol.

Introduction bibliographique

1.1.2.4 Utilisation du fer cellulaire

Une très grande partie du fer transite par la mitochondrie car c'est le site de synthèse des hèmes et des centres Fe-S (Richardson & al, 2010). Ainsi la mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme du fer intracellulaire. Alors que les processus de transport du fer au travers de la membrane matricielle de la mitochondrie sont relativement bien connus aujourd'hui, les processus d'acheminement du fer depuis le cytosol et du passage à travers la membrane externe de la mitochondrie sont encore très peu connus. Plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet.

Un premier mécanisme a été décrit dans les réticulocytes avec un transfert direct inter-organelles entre la mitochondrie et les endosomes contenant le complexe $2x(\text{Fe}^{3+}\text{-Tf})\text{-TfR1}$ (Sheftel & al, 2007). Dans ce modèle appelé « kiss and run » les endosomes interagissent directement avec la membrane externe mitochondriale pour permettre le transfert direct de Fe^{2+} . Ce mécanisme n'a pas été encore décrit dans d'autres types cellulaires.

Un second mécanisme impliquant un transfert de fer direct du LIP cytosolique vers la mitochondrie par le biais de protéines cytoplasmiques ou par des ligands de faible poids moléculaire a été proposé. Des enzymes de la famille des glutaredoxines (Grx), des oxydoréductases à thiol capable de lier des centres Fe-S, ont été proposées comme métallo-chaperonnes apportant le fer à la mitochondrie. Dans la levure la double délétion des gènes codant pour Grx3 et Grx4 entraîne un défaut d'import du fer dans la mitochondrie, ce qui a pour conséquence une forte diminution de la biosynthèse des centres Fe-S et des hèmes (Mühlenhoff & al, 2010 ; Rouhier & al, 2010). L'import du fer par Grx3/4 se ferait potentiellement via des complexes hétérodimériques avec des protéines de la famille BOLA (Li & al, 2009). Cependant, le mécanisme par lequel le centre Fe-S des Grx est dégradé est inconnu, notamment comment sont pris en charge les ions sulfures libérés au cours de cette dégradation et qui sont potentiellement toxiques pour la cellule. Des sidérophores ont aussi été proposés comme candidat potentiel, notamment le 2,5-DHBA. En effet, la déplétion de l'enzyme BDH2 catalysant la synthèse de 2,5-DHBA dans les cellules érythroleucémiques de souris augmente très fortement la quantité de fer cytosolique et de manière concomitante entraîne une diminution drastique de la quantité de fer mitochondrial (Devireddy & al, 2010). Le GSH complexé au Fe^{2+} est aussi considéré comme un transporteur potentiel vers la mitochondrie. Les flux de GSH vers la mitochondrie semblent notamment facilités par les échanges di-anioniques entre $\text{malate}^{2-}/\text{HPO}_4^{2-}$ et l'acide 2-oxoglutarique²⁻/malate²⁻ (Chen & Lash, 1998 ; Lash, 2006).

Le transport du fer à travers la membrane externe mitochondriale est assez peu connu mais les porines ont été décrites comme étant capable de réaliser ce transfert (Lane & al, 2015). Le transport du fer à travers la membrane interne mitochondriale est beaucoup mieux décrit. Ce transport est principalement réalisé par les mitoferrines 1 et 2 (Mfrn1, Mfrn2) chez les eucaryotes supérieurs (Shaw & al, 2006 ; Paradkar & al, 2009). Une interaction entre Mfrn1 et le transporteur ABC (ATP-binding

Introduction bibliographique

cassette transporter) ACBB10 augmenterait sa stabilité et son activité afin de transporter le fer à travers la membrane interne mitochondriale (Chen & al, 2009). De plus la ferrochélatase FECH qui réalise l'insertion du fer dans les porphyrines pour produire des hèmes, forme un complexe oligomérique transitoire avec la Mfn1 et ACBB10 afin de faciliter l'import de fer (Chen & al, 2010). Des homologues de Mfn1 et 2 ont également été identifiés dans la levure et sont appelés Mrs3 et 4 (Foury & Roganti, 2002).

1.2 Homéostasie du fer chez *E. coli*

1.2.1 Acquisition du fer

L'acquisition du fer est un enjeu majeur pour les bactéries car sa disponibilité est totalement dépendante de leur milieu extracellulaire. Dans des milieux extracellulaires riches en oxygène avec un pH compris entre 7,0 et 8,0, le fer ferreux Fe^{2+} n'est pas stable et s'oxyde en fer ferrique Fe^{3+} qui est très peu soluble dans ces conditions de pH. Les bactéries ont ainsi mis en place plusieurs stratégies afin d'acquérir du fer : 1) via des chélateurs possédants une très haute affinité pour le fer ferrique libre ou des hèmes libres capables de capter le fer extracellulaire appelé sidérophores ou hémophores en condition aérobie ; (2) via un système d'acquisition de fer ferreux libre en conditions anaérobie ; (3) de même que chez les eucaryotes, les procaryotes possèdent des systèmes très efficaces de stockage du fer permettant de le mobiliser rapidement en condition de carence ; (4) le développement de systèmes de résistance au stress redox ; (5) une régulation des protéines contenant du fer ou impliquées dans l'homéostasie du fer.

1.2.1.1 Acquisition du fer ferrique par les sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (< 2000 Da) caractérisés par une très grande affinité et spécificité pour le fer ferrique (Byers & Arceneaux, 1998). Plus de 500 sidérophores ont été caractérisés et sont classifiés selon la fonction chimique du ligand qui chélate le fer (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Il existe 3 familles différentes, les phénolates-catécholates, les hydroxamates et les acides hydroxycarboxyliques (Hider & Kong, 2010). *E. coli* est capable de synthétiser des sidérophores comme l'entérobactine (aussi appelée entérocheline) (Raymond & al, 2003) mais aussi d'utiliser des sidérophores exogènes synthétisés par d'autres micro-organismes tels que les microchampignons (Matzanke & al, 1997). La synthèse de ces sidérophores est régulée par le niveau de fer intracellulaire présent au sein de la bactérie.

Les complexes Fe^{3+} -sidérophore sont reconnus par des récepteurs à haute affinité situés sur la membrane externe des bactéries (**Figure 5**). Ces récepteurs sont structurés en tonneau β composés de

Introduction bibliographique

22 feuillets β antiparallèles ancrés à la membrane externe permettant de relier le périplasma et l'environnement extérieur. Le centre du tonneau β est bouché par un domaine globulaire d'environ 160 résidus situé au niveau du N-terminal limitant l'accès au périplasma en l'absence du complexe Fe^{3+} -sidérophore (Buchanan & al, 1999 ; Ferguson & al, 1998). La fixation du complexe Fe^{3+} -sidérophore à son récepteur entraîne un changement conformationnel au niveau du bouchon mais n'est pas suffisant pour laisser passer le complexe Fe^{3+} -sidérophore vers le périplasma (Ferguson & al, 2002). La translocation du complexe nécessite un second mécanisme énergie-dépendant via le complexe TonB-ExbB-ExbD qui utilise la force motrice du gradient de proton entre le périplasma et le cytoplasme au niveau de la membrane cytoplasmique (Larsen & al, 1994). TonB est une protéine périplasmique liée à la membrane cytoplasmique via sa partie N-terminale et interagit avec deux protéines de la membrane cytoplasmique ExbB et ExbD. Un segment hydrophobe conservé de 7 acides aminés au niveau du N-terminal des récepteurs de la membrane externe (appelé « TonB box ») est nécessaire pour l'interaction de ces récepteurs avec TonB (Postle, 1993). Les protéines ExbB et ExbD utilisent le gradient de protons de la membrane cytoplasmique pour « activer » TonB. Une fois dans sa forme active, TonB interagit avec la « TonB box » des récepteurs de la membrane externe permettant un second changement conformationnel au niveau du bouchon des récepteurs membranaires (Braun, 1995). Ce changement conformationnel permet la translocation du complexe Fe^{3+} -sidérophore vers le périplasma. Une fois dans le périplasma le complexe Fe^{3+} -sidérophore est pris en charge par des protéines de transport capables de lier un sidérophore à la fois (Köster, 2001). Ces protéines transfèrent le complexe Fe^{3+} -sidérophore vers des perméases localisées sur la membrane cytoplasmique qui sont associées à des ATPases, permettant ainsi de fournir l'énergie nécessaire à la translocation du complexe Fe^{3+} -sidérophore vers le cytoplasme. Le fer ferrique associé au sidérophore est alors réduit pour faciliter la dissociation du fer. Plusieurs enzymes cellulaires avec une activité ferriréductases sont capables de réaliser cette réduction (Fontecave & al, 1994).

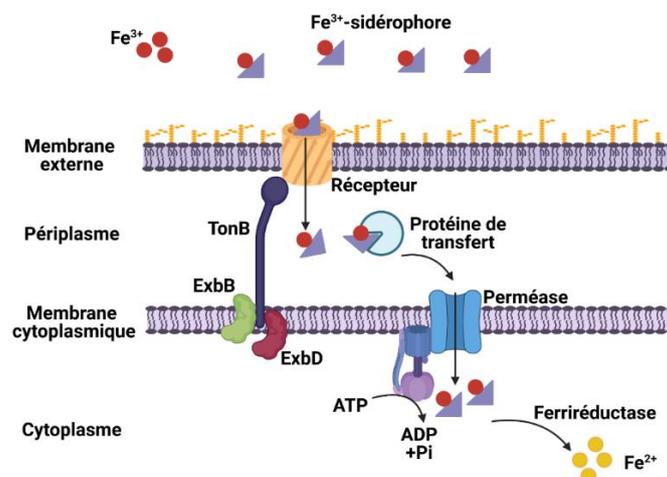


Figure 5 Acquisition du fer chez *E. coli* par les sidérophores. Les sidérophores sont importés à travers la membrane externe par des récepteurs qui leur sont spécifiques. Cette translocation nécessite une grande demande d'énergie fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Une fois dans le périplasma, le

Introduction bibliographique

sidérophore est pris en charge par des protéines spécifiques de transfert qui les emmènent vers une perméase. L'énergie de translocation de la membrane cytoplasmique est assurée par une ATPase. Une fois dans le cytoplasme, le fer du sidérophore est réduit par des ferriréductases pour être libéré. (*Inspiré de Andrews & al, 2003*)

1.2.1.2 Acquisition du fer ferreux : le système Feo

Plusieurs systèmes de transport de fer ferreux ont été caractérisés notamment le système Feo chez *E. coli* (Hantke, 1987). Les systèmes de transport du fer ferreux sont actifs en conditions anaérobies et à faible pH, conditions dans lesquelles le fer ferreux est stable et soluble. Ce système de transport est notamment retrouvé chez les bactéries qui colonisent l'appareil intestinal. L'opéron Feo est composé de 3 gènes *feoABC* (Hantke, 2003). Le fer ferreux Fe^{2+} est capable de diffuser librement au travers de la membrane externe via des porines. Une fois dans le périplasma, le fer ferreux est pris en charge par le système Feo situé à la membrane cytoplasmique.

FeoB est une protéine transmembranaire (Kammler & al, 1993) possédant 3 domaines essentiels : (1) un domaine cytosolique contenant une protéine G ; (2) un domaine inhibiteur de dissociation du GDP (GDI) ; (3) un domaine transmembranaire (Marlovits & al, 2002 ; Hantke, 2003 ; Eng & al, 2008). Le domaine transmembranaire est constitué de 8 hélices α formant un pore en son centre lui procurant ainsi une fonction de perméase à fer alors que le domaine cytosolique contenant la protéine G fournirait l'énergie nécessaire pour le transport. FeoA est une protéine dont le rôle exact dans le transport du fer ferreux est encore à déterminer. Cependant, la délétion du gène *feoA* entraîne une diminution de 60% de l'acquisition du fer ferreux (Kammler & al, 1993). Les structures de FeoA de différents organismes ont été résolues et ont mis en évidence un domaine SH3 que l'on retrouve le plus souvent chez les eucaryotes (Li, 2005). Ce domaine SH3 est parfois impliqué dans l'interaction avec les protéines G permettant des voies de transduction du signal par l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) (Hall, 1992). Il a été proposé que FeoA pourrait stimuler à l'aide de son domaine SH3 l'activité de la protéine G de FeoB (Lau & al, 2013). L'opéron Feo code pour une troisième protéine, appelée FeoC, qui semble être importante pour la régulation de l'expression de FeoA et de FeoB. FeoC possède un domaine hélice-coude-hélice au niveau de son N-terminal que l'on retrouve dans la famille des protéines LysR (famille de régulateurs de transcription chez les procaryotes) qui sont capables de lier l'ADN via ce motif spécifique (Maddocks & Oyston, 2008). De plus, FeoC possède 4 cystéines conservées capables de lier des métaux tels que le zinc ou le fer (Hung & al, 2012) mais aussi un centre $[4Fe4S]$ chez *K. pneumoniae* (Hsueh & al, 2013) ou chez *E. coli* (Smith & al, 2019). Il a été proposé que son centre $[4Fe4S]$ permette une régulation du transport Feo en fonction du niveau intracellulaire de centres Fe-S et d'oxygène (Hsueh & al, 2013 ; Smith & al, 2019).

Introduction bibliographique

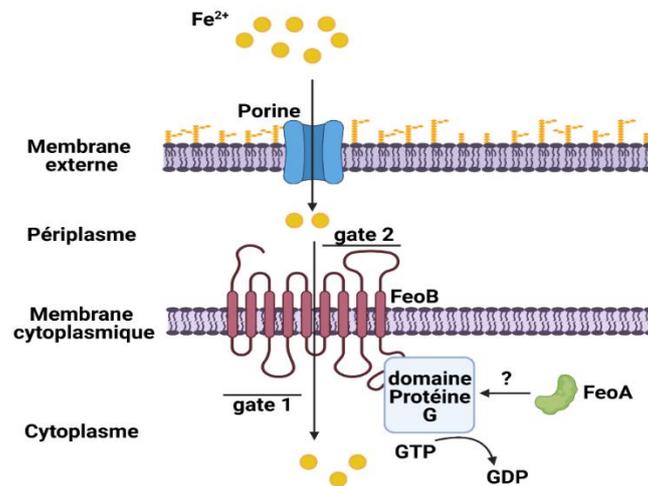
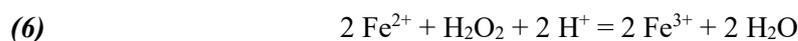


Figure 6 Acquisition du fer chez *E. coli* par le système FEO. Le fer ferreux Fe^{2+} peut traverser des porines pour atteindre le périplasme. Par la suite, ce fer est transporté par la perméase FeoB formée par les « gates » 1 et 2. Cette protéine possède un domaine protéine G potentiellement impliqué dans ce processus de transport et probablement régulé par FeoA. (*Inspiré de Lau & al, 2015*)

1.2.2 Stockage du fer

Les bactéries sont aussi capables, comme les eucaryotes, de stocker du fer (Andrews & al, 2003). Plusieurs types de protéines ont été caractérisés chez *E. coli* dont la ferritine (FtnA) que l'on retrouve chez les eucaryotes mais aussi la bactérioferritine (Bfr) et la protéine Dps (Almiron & al, 1992) que l'on retrouve uniquement chez les procaryotes. Toutes ces protéines sont composées de 24 sous-unités identiques dans FtnA et Bfr et 12 sous-unités identiques dans Dps. Ces sous-unités s'auto-assemblent sous la forme d'une sphère avec en son centre une cavité permettant le stockage du fer. FtnA et Bfr forment un complexe d'environ 500 kDa pouvant stocker entre 2000 et 3000 atomes de fer alors que les protéines Dps forment un complexe d'environ 250 kDa pouvant stocker jusqu'à 500 atomes de fer. Les protéines FtnA et Bfr stockent le fer sous forme ferrique après oxydation du fer ferreux au niveau du centre ferroxidase localisé dans la région centrale des sous-unités en utilisant l'oxygène comme oxydant comme la ferritine eucaryote (**réaction 5**). Dps stocke également le fer sous forme ferrique en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme oxydant. Une molécule d' H_2O_2 oxyde deux atomes de fer ferreux Fe^{2+} ce qui permet d'empêcher la formation de radical hydroxyle (**réaction 6**) (Zhao & al, 2002). De plus, Dps a la capacité de lier l'ADN et jouerait un rôle dans la protection de l'ADN lors d'un stress oxydant (Almiron & al, 1992).



Introduction bibliographique

1.3 Régulation du métabolisme du fer

1.3.1 Régulation du métabolisme du fer chez les eucaryotes

1.3.1.1 Régulation du métabolisme systémique du fer

La régulation de l'homéostasie du fer est un processus central pour la plupart des organismes afin d'une part, de limiter la quantité de fer libre et d'autre part, de pouvoir activer les systèmes d'acquisition lorsque le niveau fer n'est pas suffisant. Dans les organismes pluricellulaires, le premier niveau de régulation est celui du fer systémique. L'acquisition du fer est principalement régulée de manière post-transcriptionnelle par l'hepcidine, une hormone peptidique de 25 acides aminés riche en cystéine qui est sécrétée par le foie (Pigeon & al, 2000). L'hepcidine circulante dans le plasma va se lier au transporteur FPN des entérocytes, macrophages et hépatocytes afin de promouvoir leur phosphorylation, ce qui va induire leur dégradation (Nemeth & al, 2004). Les transporteurs FPN sont les seuls transporteurs caractérisés capables d'exporter le fer. Leur dégradation conduit à une diminution drastique de l'export du fer par les entérocytes, macrophages et hépatocytes vers le plasma. L'hepcidine est régulée transcriptionnellement par différents stimuli tels que la disponibilité du fer, l'inflammation et l'hypoxie (Rishi & al, 2015).

1.3.1.2 La régulation du métabolisme du fer intracellulaire, le rôle clé de la biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes

La régulation de l'homéostasie du fer intracellulaire est un phénomène complexe qui est de plus connecté à la réponse au stress oxydant et nitrosant et à l'immunité innée. Des mécanismes très différents ont été développés par les organismes procaryotes et eucaryotes, notamment sur la nature des stimuli contrôlant l'homéostasie du fer. Alors que chez les eucaryotes, les niveaux de centres Fe-S et de fer contrôlent la régulation du métabolisme du fer global, chez les procaryotes il semble que seul le niveau de fer libre soit directement détecté pour réguler le métabolisme du fer global, avec un certain nombre d'exceptions comme le système Feo qui possède un centre Fe-S.

Chez les eucaryotes supérieurs, deux protéines principales régulent le métabolisme du fer en fonction des niveaux de fer « libre » et de centres Fe-S, les protéines régulatrices IRP (**I**ron **R**egulatory **P**roteins). IRP1 et IRP2 interagissent directement avec des séquences IRE (**I**ron **R**esponsive **E**lements) situées au niveau des régions non traduites UTR (**U**n**T**ranslated **R**egion) des ARNm des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (Rouault, 2006 ; Recalcati & al, 2010 ; Wallander & al, 2006). Les IRE sont des segments d'ARNm qui possèdent une structure en épingle à cheveux. Tous les IRE partagent une séquence consensuelle: 5'-CAGUGN-3' (où N peut être U, C ou A) qui constitue la boucle. Lorsque les IRE sont placés dans la région 5' non traduites des ARNm, la fixation de IRP1 ou

Introduction bibliographique

IRP2 va empêcher la fixation du ribosome sur l'ARNm engendrant ainsi une inhibition de la traduction de cet ARNm. À l'inverse, si les IRE sont placés dans la région 3' non traduite des ARNm, la fixation de IRP1 et IRP2 va stabiliser l'ARNm et permettre une augmentation de la quantité de protéines traduites à partir de cet ARNm. Ainsi, en condition pauvre en fer, l'expression des protéines impliquées dans l'acquisition du fer : le récepteur de la transferrine TfR1 et DMT1 qui possèdent des IRE en 5' UTR, est augmentée (**Figure 7**) (Recalcati & al, 2010). Inversement, l'expression des protéines impliquées dans le stockage (ferritine) (Zahringer & al, 1976), l'export (FPN) et l'utilisation du fer (ALAS2 et mtAconitase) (Wang & Pantopoulos, 2011) sont drastiquement diminuées.

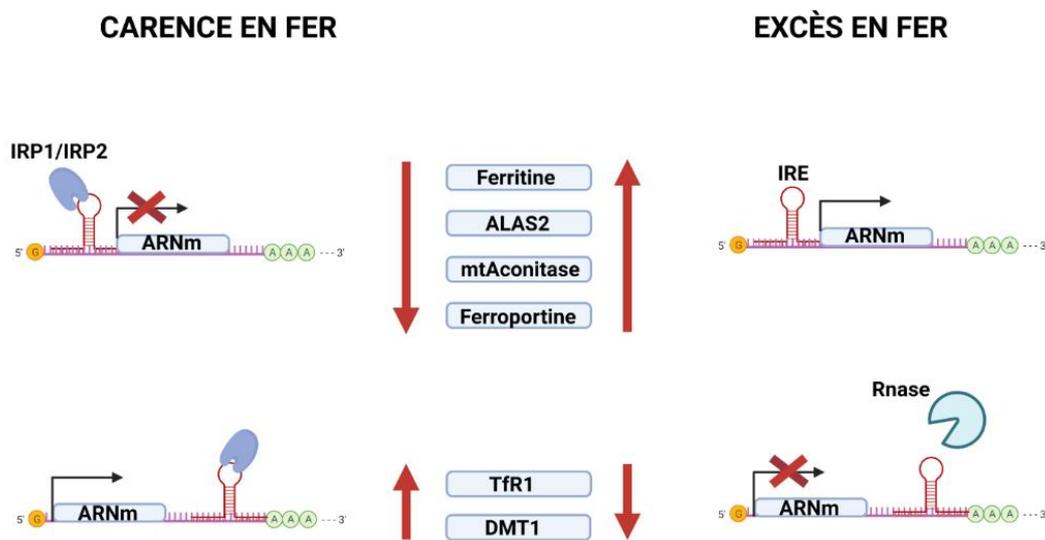


Figure 7 Régulation du fer cellulaire par les protéines IRP1 et IRP2. En carence de fer, l'expression des protéines impliquées dans le stockage (ferritine), l'exportation (ferroportine) ou l'utilisation du fer (ALAS2 et mtAconitase) est fortement inhibée. En effet les protéines régulatrices IRP1 et IRP2 vont se lier sur les IRE situés en 5' de l'ARNm empêchant leur traduction. En excès de fer, l'expression des protéines impliquées dans l'acquisition du fer (TfR1 et DMT1) est inhibée. En effet les protéines IRP1 et IRP2 ne peuvent pas se lier aux IRE situés en 3' de l'ARNm laissant les RNAses dégrader l'ARNm. (Inspiré de Galaris & al, 2019).

IRP1 est une protéine de la famille des aconitases contenant un centre [4Fe4S] qui permet la conversion du citrate en isocitrate dans la mitochondrie au cours du cycle de Krebs. IRP1 est une protéine cytosolique qui possède 30% de similitude avec la séquence de l'aconitase mitochondriale mais son activité aconitase ne semble pas nécessaire (Beinert & Kennedy, 1993). La structure du centre [4Fe4S] d'IRP1 montre que seulement 3 des 4 atomes de fer sont liés par des ligands protéiques (des cystéines), le quatrième étant lié à une molécule d'eau facilement échangeable par d'autres petites molécules. Dans le cas de l'aconitase mitochondriale cette position libre est nécessaire pour la fixation de son substrat (le citrate). Dans le cas d'IRP1 il semble que ce soit un point d'entrée pour des agents oxydants (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}) et nitrosants (NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot}) qui réagissent avec ce fer et induisent la dégradation du centre Fe-S. Lorsque le centre [4Fe4S] est dégradé, la protéine est principalement sous sa forme apo-

Introduction bibliographique

IRP1 (sans son centre [4Fe4S]) et perd son activité aconitase mais acquiert une fonction de liaison aux IRE des ARNm cibles. IRP1 est donc une protéine bifonctionnelle régulée par la présence ou non de son centre [4Fe4S] (Walden & al, 2006) et permet d'établir un lien entre régulation du métabolisme du fer, biosynthèse de centres Fe-S et stress oxydants et nitrosants (Caltagirone & al, 2001 ; Bouton & Drapier, 2003).

IRP2 partage 60% de similitude de séquence avec IRP1 mais ne possède pas de centre [4Fe4S]. La régulation d'IRP2 est intimement liée à sa stabilité. Dans des conditions riches en fer, IRP2 est dégradée par ubiquitination par le protéasome, tandis que dans des conditions pauvres en fer, IRP2 est stabilisée et va donc pouvoir se lier aux IRE (Guo & al, 1995 ; Hanson & al, 2003). Il a été proposé qu'un domaine d'IRP2 (qui n'est pas présent dans IRP1) de 73 acides aminés riches en résidus cystéine soit responsable de la dégradation de IRP2 (Iwai & al, 1998). L'oxydation des cystéines présentes dans ce domaine initié par la fixation d'un atome de fer ou par la fixation d'un hème a été proposé comme marqueur de dégradation par le protéasome. Cependant ce modèle a été écarté, car un mutant des cystéines est toujours aussi sensible à la dégradation par le protéasome que la protéine sauvage (Wang & al, 2004). Plus récemment, la protéine FBXL5 (F-Box and leucine-rich repeat protein 5) a été identifiée comme un acteur essentiel de la polyubiquitination d'IRP2 en réponse au fer (Salahudeen & al, 2009 ; Vashisht & al, 2009). Cette protéine de la famille ubiquitine ligase reconnaît spécifiquement IRP2 et induit le recrutement des protéines SPK1 (S-phase kinase-associated protein 1), Cull1 (cullin 1) et Rbx1 (ring-box 1) qui vont former un complexe initiant l'ubiquitination d'IRP2. FBXL5 possède un domaine hémérythrine capable de fixer deux atomes de fer qui stabilisent la protéine, empêchant ainsi sa dégradation par le protéasome (Chollangi & al, 2012). Une carence en fer entraîne la dégradation de FBXL5 et donc inversement la stabilisation d'IRP2. Des conditions riches en oxygène semblent également capables d'entraîner la dégradation du centre à fer de FBXL5 et ainsi conduire à une stimulation de l'acquisition du fer, probablement pour aider à remplacer les protéines dégradées en conditions superoxygènes. Très récemment, il a été montré que FBXL5 fixe aussi un centre [2Fe2S] (Wang & al, 2020). La structure résolue par cryo-microscopie électronique du complexe IRP2-FBXL5-SPK1-Cull1 montre que le centre [2Fe2S] de FBXL5 est nécessaire pour interagir avec IRP2 (Wang & al, 2020). La présence de ce centre Fe-S suggère fortement que FBXL5 est également sensible à l'activité de biosynthèse des centres Fe-S. De plus, ce complexe d'ubiquitination ne semble actif que lorsque le centre [2Fe2S] est oxydé et des concentrations en oxygène très élevées semblent nécessaires pour y parvenir *in vitro* (21 %). Or, la concentration en oxygène dans les tissus est de l'ordre de 3 % ce qui semble trop faible pour permettre l'oxydation du centre Fe-S. Ce mécanisme de régulation d'IRP2 ne serait donc opérant que dans des tissus exposés à de fortes concentrations en oxygène, comme les poumons. Mais alors comment fonctionne la régulation du métabolisme du fer par IRP2 dans les tissus qui ne sont pas hyperoxygénés ? Une étude récente dans des cellules eucaryotes a montré que l'inhibition des machineries d'assemblage des centres Fe-S permettait une activation de liaison entre IRP2 et les

Introduction bibliographique

IRE de manière indépendante de IRP1, de FBLX5 et de sa propre stabilité (Terzi & al, 2021). Les auteurs proposent qu'une autre protéine, de nature inconnue, liant un centre Fe-S et sensible au niveau des centres Fe-S cellulaire, interagirait avec IRP2 pour réguler son activité. De plus, ce mécanisme serait fonctionnel à un faible taux d'oxygène (3 %), donc pertinent pour la plupart des tissus de l'organisme. La régulation par FBXL5 serait donc restreinte aux tissus hyperoxygénés et ce mécanisme inconnu serait la voie générale de régulation d'IRP2 dans l'organisme.

1.3.2 Régulation du fer et des centres Fe-S dans les bactéries

La régulation du fer est effectuée dans les bactéries à Gram-négatif par la protéine Fur (Ferric-Uptake Regulator) qui est un répresseur transcriptionnel (Hantke, 1984 ; Bagg & Neilands, 1987). L'équipe du Dr. Hantke a montré que Fur régulait près de 100 gènes chez *E. coli* dont 60 % sont impliqués dans l'acquisition du fer (Hantke, 2001). Fur est une protéine homodimérique de 2 x 17 kDa comportant un domaine N-terminal impliqué dans la liaison avec l'ADN et un domaine C-terminal possédant plusieurs sites de fixation pour des métaux (Bradley & al, 2020). Un site très proche du C-terminal permet de lier un atome de zinc qui est essentiel dans la stabilisation du dimère (D'Autréaux & al, 2007). Fur possède un second site, dit site de régulation, permettant la fixation d'un atome de fer lui conférant la propriété de se lier à des domaines spécifiques de l'ADN. En présence de forte concentration en fer dans la bactérie, Fur va lier un atome de fer par monomère (Fe-Fur) ce qui entraîne un changement conformationnel augmentant par 1000 fois son affinité de liaison avec l'ADN. Fur se fixe à des séquences spécifiques appelées « Fur-Box » situées au niveau du promoteur des gènes cibles. Cette interaction bloque l'interaction de l'ARN polymérase et ainsi la transcription des gènes cibles (Escolar & al, 1997) (**Figure 8a**).

Fur est aussi capable d'agir comme un régulateur positif en réprimant l'expression d'un petit ARN de 90 paires de bases appelé RyhB qui déstabilise les ARN messagers codant pour les protéines impliquées dans le stockage (ferritine et bactérioferritine) et dans l'utilisation du fer (protéines impliquées dans le cycle de Krebs : l'aconitase AcnA, la fumarase FumA, et les déshydrogénases SdhA-B-C-D) ainsi que certaines protéines à fer telles que la superoxyde dismutase b (SodB) (Massé & Gottesman, 2002). RyhB est aussi impliqué dans la régulation de l'expression des machineries ISC et SUF qui réalisent la synthèse des centres Fe-S chez les procaryotes. Chez *E. coli* la machinerie ISC est exprimée en condition basale et la machinerie SUF en conditions de carence en fer ou lors d'un stress oxydatif (Roche & al, 2013). RyhB induit la dégradation des ARNm des gènes codant pour les protéines de la machinerie ISC, sauf celui de IscR, un régulateur transcriptionnel de la machinerie ISC, qui est stabilisé en présence de RyhB (Desnoyers & al, 2009). IscR fixe un centre [2Fe2S] qui lui procure une activité de répresseur transcriptionnel de l'opéron ISC. Sous forme apo-protéine, IscR est un activateur de l'opéron SUF (Mettert & Kiley, 2014). Ainsi en condition de carence en fer, RyhB est exprimé et

Introduction bibliographique

induit une diminution de la quantité de protéines de la machinerie ISC, sauf IscR. La machinerie ISC produisant aussi moins de centres Fe-S dans ces conditions, apo-IscR s'accumule et vient induire l'expression de l'opéron *SUF*. Ainsi, en condition de carence en fer, c'est la machinerie *SUF* qui assure la synthèse des centres Fe-S probablement en raison de sa meilleure capacité à fonctionner dans ces conditions. RyhB n'est pas essentiel à l'activation de la machinerie *SUF* en carence de fer, mais semble jouer un rôle crucial en accélérant le passage de la machinerie ISC à la machinerie *SUF* dans ces conditions (**Figure 8b**).

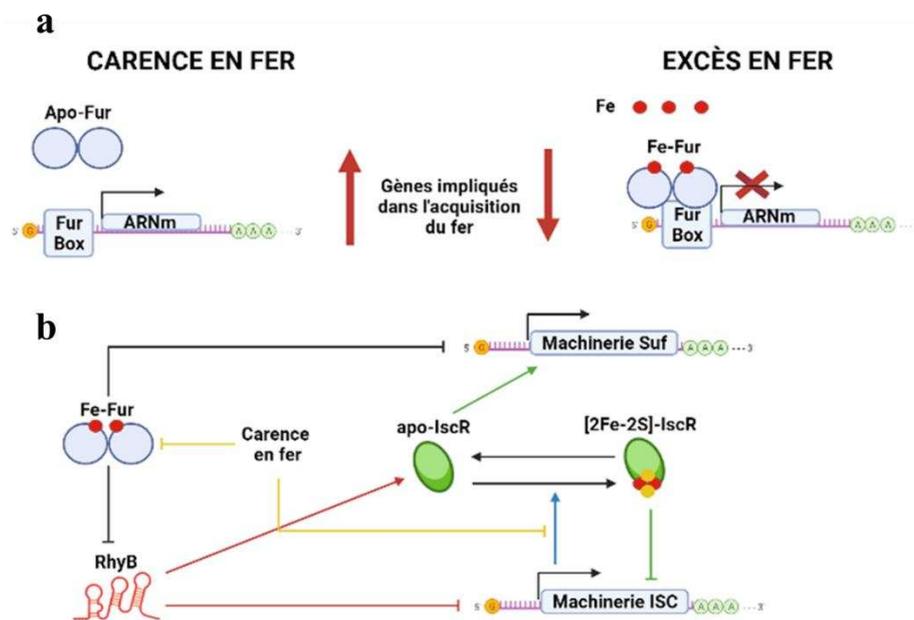


Figure 8 Régulation du fer et des centres Fe-S chez *E. coli*. (a) Un excès en fer dans la bactérie permet d'activer le dimère de la protéine Fur qui lie un atome de fer par monomère Fe-Fur. Cette activation permet la liaison du dimère sur la « Fur box » présente dans la région 5' des ARNm des protéines impliquées dans l'acquisition du fer afin d'inhiber leur traduction. (b) IscR est la protéine régulatrice des centres Fe-S au sein de la bactérie. Sous sa forme apo-IscR est capable d'activer la machinerie *SUF* lors d'une carence en fer ou d'un stress oxydatif. Dans sa forme holo-IscR inhibe la machinerie *ISC*. Le petit ARN *RyhB* va permettre l'inhibition de la machinerie *ISC* en dégradant les ARNm des protéines impliquées dans cette machinerie sauf l'ARNm de *IscR* qui est stabilisé permettant l'activation de la machinerie *SUF*. *RyhB* et la machinerie *SUF* sont négativement régulés par le dimère Fe-Fur. (*Inspiré de Chareyre & Mandin, 2018*)

Ainsi, à la différence des organismes eucaryotes, le niveau de biogenèse des centres Fe-S ne semble pas agir directement sur l'import et le stockage du fer. Le stimulus permettant cette régulation semble être uniquement le fer « libre » qui régule également l'expression des machineries *ISC* et *SUF*. À l'inverse, chez les eucaryotes le niveau de synthèse des centres Fe-S agit en parallèle du niveau de fer « libre » comme stimuli pour directement réguler le métabolisme du fer (Lill & al, 2012).

Introduction bibliographique

2. Les centres fer-soufre (Fe-S)

2.1 La diversité des centres Fe-S

La première protéine à centre Fe-S a été découverte au début des années 1960, grâce à un signal RPE à $g = 1,9$ dans la NADH déshydrogénase qui n'avait jamais été observé auparavant (Beinert & Sands, 1960). Les dosages de fer et de soufre inorganique ainsi que les déterminations de structures ont permis de révéler une composition chimique totalement nouvelle. Depuis ce jour le nombre de protéines identifiées contenant un centre Fe-S n'a cessé d'augmenter. Chez *E. coli* près de 90 protéines Fe-S ont été identifiées expérimentalement et jusqu'à 150 sur la base d'un modèle de prédictions (<http://biodev.cea.fr>). L'application de ce modèle à plusieurs organismes procaryotes indique qu'environ 5 à 7 % des protéines de ces génomes seraient des protéines Fe-S. Chez l'homme, un recensement systématique à partir de données biochimiques et structurales a permis de dénombrier 70 protéines Fe-S, soit environ 0.3 % du génome, mais il est probable que d'autres protéines Fe-S restent à découvrir.

Les centres Fe-S sont composés d'atomes de fer et d'ions sulfures (S^{2-}) assemblés en différentes structures tridimensionnelle. Les centres Fe-S sont classés selon leur nombre d'atomes de fer et de soufre, comme suggéré par le « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) » en 1989. Dans cette convention, les atomes de fer et de soufre inorganique sont placés entre crochets avec en exposant la charge globale de cet ensemble reflétant le degré d'oxydation des atomes de fer étant donné que les sulfures sont toujours considérés à l'état -II. Les formes les plus courantes des centres Fe-S sont les centres rhombiques $[2Fe2S]$ et les centres cubiques $[4Fe4S]$ (**Figure 9**). Il existe également des centres $[3Fe4S]$ produits de la dégradation des centres $[4Fe4S]$ et d'autres plus complexes comme les centres $[Mo/V-7Fe9S-C]$ et $[8Fe7S]$ de la nitrogénase. Les centres Fe-S sont coordonnés aux protéines via leurs atomes de fer par différents ligands protéiques, principalement les groupements thiols des cystéines et les azotes des histidines. Cependant, d'autres ligands protéiques existent, tels que les azotes des résidus arginines et les atomes d'oxygène des résidus sérine, aspartate et glutamine. En l'absence de ligand protéique ou par échange, des ligands exogènes peuvent se fixer aux fers des centres Fe-S, la plupart du temps il s'agit des substrats de ces enzymes, d'un cofacteur ou encore d'une molécule d'eau.

Dans les centres $[2Fe2S]$, les atomes de fer ont une géométrie tétraédrique (**Figure 9a**). Le fer peut être présent sous deux états redox différents, ferrique (Fe^{3+}) et ferreux (Fe^{2+}) et les ions sulfures restent globalement au même état redox formel (-II) mais participent à l'état redox global du centre Fe-S par délocalisation de densité électronique. Les centres $[2Fe2S]$ existent principalement sous deux états d'oxydation différents, un état oxydé $[2Fe2S]^{2+}$ où les deux fers sont sous forme ferrique, et un état réduit $[2Fe2S]^+$ où l'un des deux fers est sous forme ferrique et l'autre sous forme ferreuse (Lu, 2018). Il est cependant possible de générer de manière chimique un état super-réduit, $[2Fe2S]^0$, dans certaines protéines et des complexes modèles où les deux fers sont ferreux, mais cet état redox n'a jamais été

Introduction bibliographique

décrit comme intermédiaire dans le fonctionnement d'enzymes Fe-S (Leggate & al, 2004 ; Im & al, 1997).

Les centres [4Fe4S] sont composés de quatre atomes de fer et de quatre atomes de soufre formant un cube avec alternativement des atomes de fer et de soufre à chaque sommet. Les atomes de fer ont une géométrie tétraédrique déformée (**Figure 9b**). Les centres [4Fe4S] sont trouvés sous trois états d'oxydation : [4Fe4S]³⁺, [4Fe4S]²⁺ et [4Fe4S]¹⁺ dans les réactions biologiques où respectivement un, deux et trois atomes de fer sont formellement ferreux, les autres étant ferriques (Lu, 2018). Cependant, les électrons peuvent être délocalisés dans ce type de centre Fe-S ce qui ne permet pas d'attribuer un état redox formel à l'un ou l'autre des atomes de fer. Il est également possible d'obtenir un centre hyper réduit, [4Fe4S]⁰, par voie chimique (Scott & al, 2005 ; Deng & Holm, 2008) mais il ne semble pas que cet état redox soit accessible dans un contexte biologique. Les trois états redox accessibles constituent deux couples redox associés à des potentiels redox distincts : le couple [4Fe4S]^{2+/1+} qui est le plus fréquemment rencontré et le couple [4Fe4S]^{3+/2+} avec un potentiel redox plus élevé propre aux protéines à haut potentiel, appelées HiPiPs (High Potential iron-sulfur Proteins).

Les centres [3Fe4S] sont composés de trois atomes de fer et de quatre atomes de soufre (**Figure 9c**). Ces centres sont le produit d'une dégradation d'un centre [4Fe4S] par perte d'un fer et dans certains cas peuvent récupérer ce fer en présence de fer ferreux (Bulteau & al, 2004). Les centres [3Fe4S] existent sous deux formes d'oxydation différentes : un état oxydé [3Fe4S]¹⁺ et un état réduit [3Fe4S]⁰ où respectivement 0 et 1 atome de fer est ferreux et tous les autres ferriques (Lu, 2018).

Des centres Fe-S plus complexes sont retrouvés chez certaines protéines telles que la nitrogénase. La nitrogénase possède deux types de centres Fe-S atypiques : le centre P [8Fe7S] et le cofacteur à molybdène ou vanadium (Fe-Mo/Vco) constitué d'un centre [7Fe9S-C] et d'un atome de Mo/V ayant remplacé un atome de fer (Rees, 2002). La CO déshydrogénase (CoDH) possède aussi un centre « exotique » constitué d'un centre [4Fe4S] au sein duquel est inséré un ion nickel (Rees, 2002).

Les centres Fe-S sont caractérisés par leur potentiel redox qui dépend de la nature des ligands, la géométrie et l'environnement protéique. Comme évoqué au début de cette introduction, les protéines à centres Fe-S couvrent ainsi une très large gamme de potentiel redox (- 400 mV à 500 mV) correspondant à la quasi-totalité des potentiels redox accessibles en solution aqueuse (-400 mV à 800 mV) leur permettant ainsi de réaliser un très grand nombre de fonctions au sein de la cellule (Meyer, 2008).

Introduction bibliographique

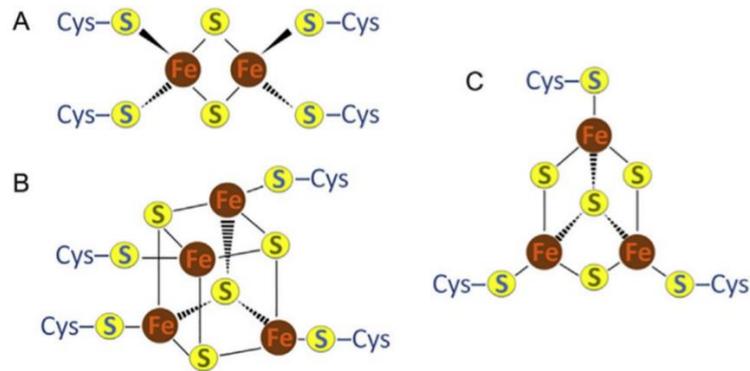


Figure 9 Les différentes structures des centres Fe-S. (a) Le centre rhombique [2Fe2S], (b) Le centre cubique [4Fe4S], (c) Le centre cubique dérivé [3Fe4S]. (Issue de Khodour & al, 2019)

2.2 Le rôle des centres Fe-S

Les fonctions biochimiques des centres Fe-S peuvent être classées en 5 groupes : (1) le transfert d'électron, (2) la catalyse redox, (3) la catalyse non-redox, (4) l'interaction avec l'ADN et l'ARN et (5) la maturation des protéines à centre Fe-S. Ces fonctions biochimiques permettent de couvrir un très large spectre de processus biologiques tels que la production d'ATP, le cycle de Krebs, la fonctionnalisation de biomolécules, la maintenance de l'intégrité du génome ou encore la synthèse protéique.

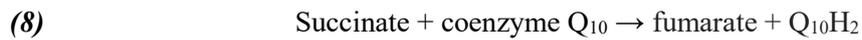
2.2.1 Le transfert d'électron : exemple de la chaîne respiratoire mitochondriale

De par la gamme de potentiel redox accessible, les centres Fe-S jouent un rôle primordial dans les chaînes de transfert d'électron des mitochondries et du périplasma des bactéries qui catalysent la production d'ATP. Cette chaîne, appelée chaîne respiratoire, est composée de 4 complexes protéiques dénotés I à IV contenant jusqu'à 14 centres Fe-S. Les électrons circulent d'un centre Fe-S donneur vers un centre Fe-S accepteur selon un gradient de potentiel redox qui est couplé à la translocation de protons depuis la matrice mitochondriale et le cytoplasme des bactéries vers respectivement l'espace intermembranaire et le périplasma, créant ainsi un gradient de concentration de proton utilisé par l'ATP synthase afin de produire de l'ATP. Le complexe I appelé NADH déshydrogénase est constitué de 46 sous-unités d'une masse d'environ 1000 kDa et est le premier point d'entrée des électrons (Lenaz & al, 2006). Une molécule de NADH est oxydée en NAD^+ au niveau du cofacteur flavine mononucléotide (FMN) générant deux électrons qui sont transportés un à un au sein du complexe I via 9 centres Fe-S dont 2 centres [2Fe2S] et 7 centres [4Fe4S] (Ohnishi & al, 1998 ; Sazanov & Hinchliffe, 2006). Ces électrons vont permettre la réduction de la coenzyme Q_{10} en ubiquinol Q_{10}H_2 (**Figure 10 et réaction 7**).



Introduction bibliographique

Le deuxième point d'entrée des électrons se situe au niveau du complexe II appelé succinate déshydrogénase. Cette enzyme est constituée de 4 sous-unités et possède plusieurs cofacteurs : une flavine adénine dinucléotide (FAD), un groupe héminique ainsi que 3 centres [4Fe4S]. Le cofacteur FAD catalyse l'oxydation du succinate en fumarate générant deux électrons transportés un à un par le biais de 3 centres [4Fe4S] afin de réduire également la coenzyme Q₁₀ (**Figure 10 et réaction 8**). Cette enzyme intervient également dans le cycle de Krebs.



Le complexe III appelé cytochrome c réductase est un dimère composé de 11 sous-unités contenant un centre [2Fe2S], un cytochrome c et deux cytochromes b sur chaque monomère. Ce complexe catalyse l'oxydation d'une molécule d'ubiquinol Q₁₀H₂ et la réduction de deux cytochromes c qui peuvent transporter uniquement un seul électron à la fois (**Figure 10 et réaction 9**).



L'accepteur final d'électron est l'oxygène qui est réduit en H₂O par la cytochrome c oxydase au sein du complexe IV à partir du cytochrome c réduit provenant du complexe III (**Figure 10 et réaction 10**).

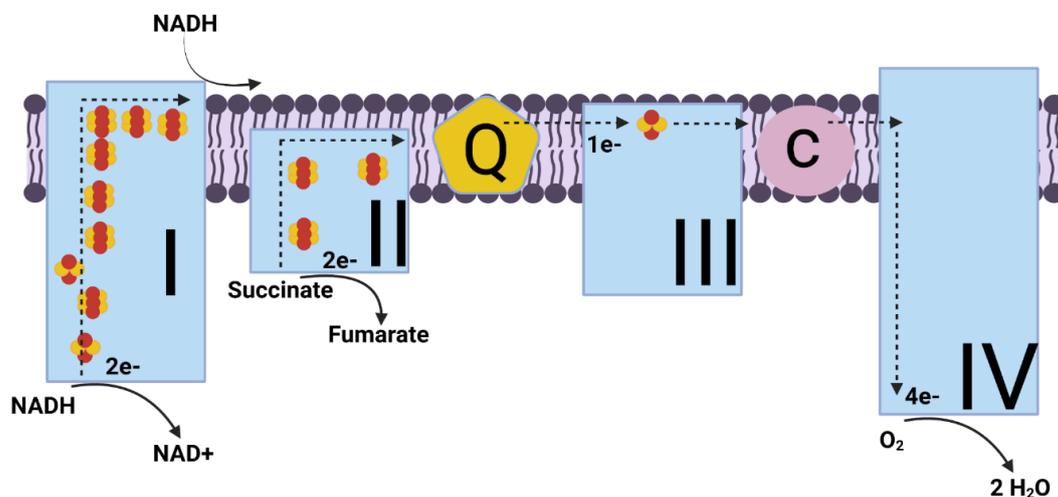
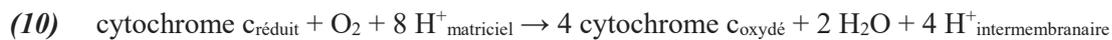


Figure 10 Le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. Une molécule de NADH est oxydée en NAD⁺ par le cofacteur FMN du complexe I générant 2 électrons qui sont par la suite transférés un à un par l'intermédiaire de 9 centres Fe-S afin de réaliser la réduction de la coenzyme Q₁₀ en ubiquinol Q₁₀H₂. Le complexe II réduit également la coenzyme Q₁₀ en oxydant une molécule de succinate en fumarate générant 2 électrons transférés par 3 centres [4Fe4S]. L'ubiquinol Q₁₀H₂ transporte les électrons jusqu'au complexe III qui l'oxyde afin de réduire deux cytochromes c. Les cytochromes c réduits fournissent les électrons au complexe IV afin de réduire l'accepteur final qu'est l'oxygène en molécule d'eau.

Introduction bibliographique

2.2.2 La catalyse redox: exemple des enzymes à radical S-adénosyl méthionine (SAM)

La superfamille des radical-SAM est impliquée dans de très nombreux processus biologiques tels que la biosynthèse de vitamines, le métabolisme des lipides ainsi que la modification des ARN de transfert (ARNt). La plupart de ces enzymes possèdent un motif extrêmement conservé CxxxCxxC (avec x correspondant à n'importe quel acide aminé) contenant 3 cystéines permettant la fixation d'un centre [4Fe4S] avec une position échangeable (Benjdia & al, 2017). Le SAM se lie au quatrième atome de fer du centre [4Fe4S] de manière bidentate (Holliday & al, 2018). Le centre [4Fe4S]¹⁺ va réduire et cliver le SAM générant de la méthionine et du 5'-dAdo[•], une espèce radicalaire hautement réactive (Frey & al, 2008) (**Figure 11**). Le centre Fe-S change son état d'oxydation en devenant un centre [4Fe4S]²⁺ (Broderick & al, 2018). L'espèce radicalaire 5'-dAdo[•] formée va réaliser différentes réactions notamment par abstraction d'hydrogène radicalaire sur une chaîne alcane, une réaction extrêmement difficile à réaliser en chimie, pour conduire à des réactions de méthylation, d'insertion de soufre, de décarboxylation ou encore d'oxydation d'alcool (Atta & al, 2012 ; Nicolet, 2020) (**Figure 12**). La régiosélectivité de ces réactions est contrôlée par la structure des sites protéique de liaison des substrats.

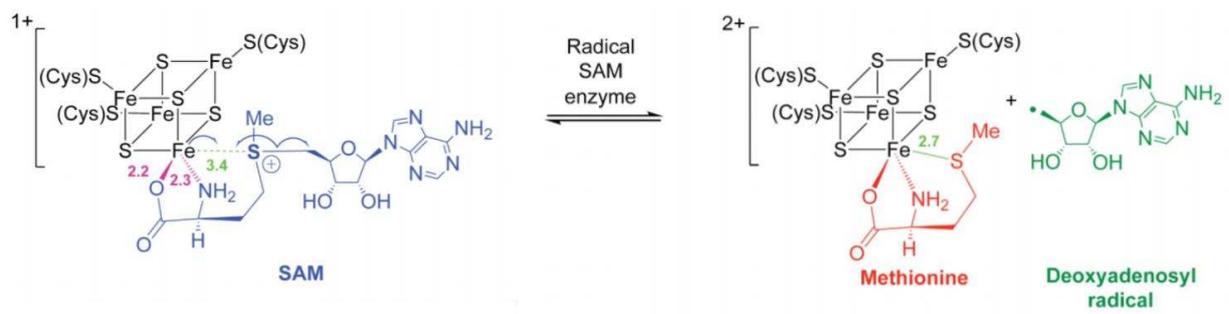


Figure 11 Le fonctionnement des enzymes radical S-adénosyl méthionine (SAM). La molécule de SAM (bleu) se lie à un centre [4Fe4S] (noir) par un de ces atomes de fer. Le centre [4Fe4S] permet la réduction et le clivage du SAM en générant une molécule de méthionine (rouge) et une espèce radicalaire 5'-dAdo[•] (vert). Cette espèce radicalaire va permettre de réaliser un grand nombre de réactions telles que la méthylation ou l'insertion d'un atome de soufre. (*Adapté de la thèse de Beata Monfort intitulée Interaction studies between the [FeFe]-hydrogenase maturation enzymes from Thermoanaerobacter italicus*)

Introduction bibliographique

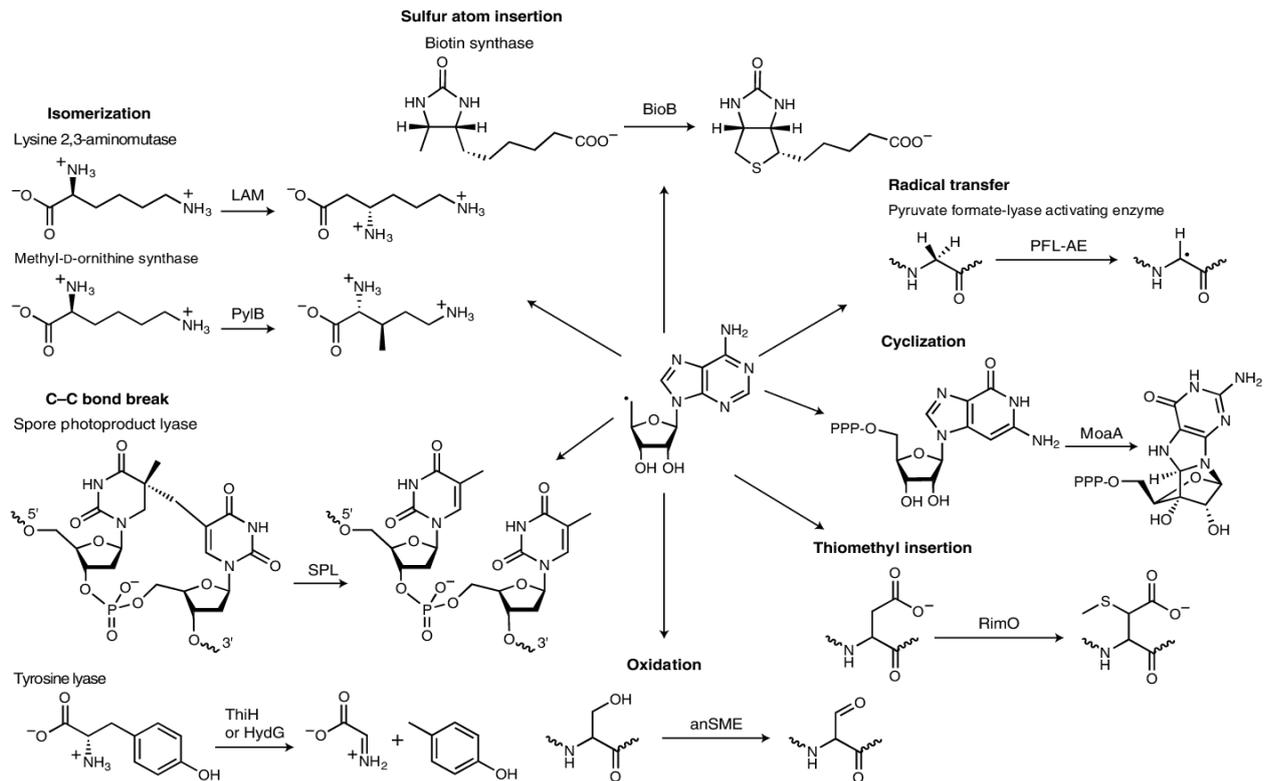


Figure 12 Diversité de réactions réalisées par les enzymes radical S-adenosyl méthionine (SAM). Ces enzymes SAM peuvent réaliser des réactions chimiques très compliquées. Diverses réactions chimiques sont présentées dont l'insertion d'un atome de soufre et d'un thiométhyle, des isomérisations, des cyclisations, des oxydations, des transferts de radical et des clivages de liaisons carbone-carbone (C-C). (Issue de Nicolet, 2020)

2.2.3 La catalyse non redox: exemple de l'aconitase

L'aconitase est une protéine de 83 kDa possédant un centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ permettant de réaliser l'isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate dans le cycle de Krebs (Zheng & al, 1990). Le centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ est coordonné par trois cystéines, le dernier atome de fer est lié par une molécule d'eau. La première étape est la fixation d'une molécule de citrate au centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ par échange avec la molécule d'eau via le groupement hydroxyle et l'acide carboxylique portés par le carbone β du citrate (**Figure 13**). La fixation au centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ favorise le départ du groupement hydroxyle fixé au fer conduisant à l'élimination d'une molécule d'eau et la création d'une double liaison C=C entre les carbones α et β créant ainsi l'intermédiaire cis-aconitate. Cet intermédiaire se dissocie et après rotation vient se fixer à nouveau au centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ via l'acide carboxylique porté par le carbone α . La fixation au centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ favorise alors une réaction d'addition d'un hydroxyle sur la double liaison au niveau du carbone α (Castro & al, 2019). Dans cet exemple, le centre $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ interagit directement avec le substrat et joue un rôle d'acide de Lewis (**Figure 13**).

Introduction bibliographique

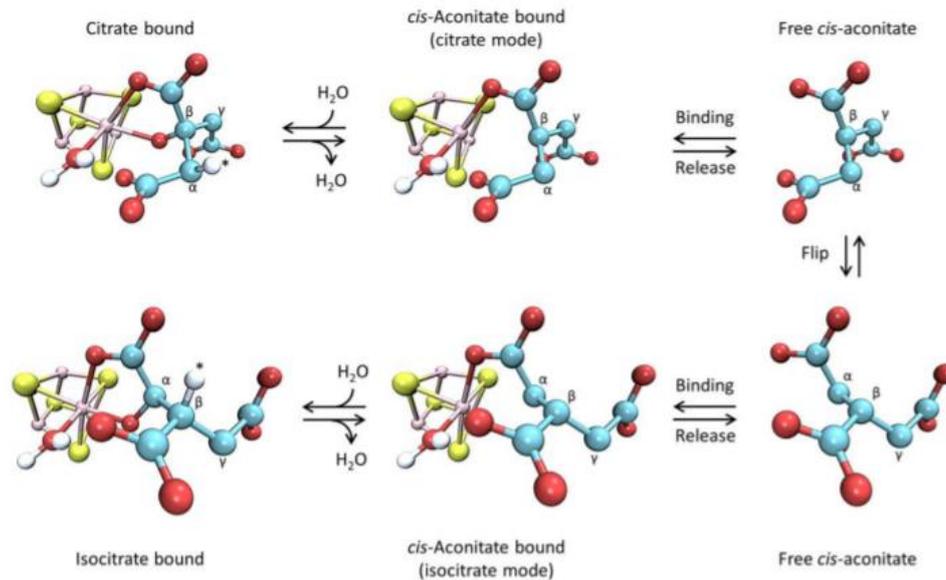


Figure 13 Mode d'action de l'aconitase. L'aconitase lie de manière stéréospécifique le citrate via son centre [4Fe4S]. Une étape de déshydratation permet le clivage d'un hydroxyle et d'un atome d'hydrogène du citrate formant l'intermédiaire cis-aconitate. Cet intermédiaire se dissocie de l'aconitase pour réorienter de 180° son C α et son C β . L'intermédiaire réorienté se refixe à l'aconitase pour subir une hydratation pour se transformer en isocitrate. (Issue de Castro & al, 2019)

2.2.4 L'interaction avec l'ADN : exemple de l'hélicase XPD

Le maintien de l'intégrité du génome est essentiel à la survie cellulaire car le génome est continuellement soumis à diverses agressions par différents facteurs exogènes comme par exemple les ultraviolets ou subit des lésions dues aux espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) formées par l'organisme (Fuss & al, 2015). Un très grand nombre de protéines nucléaires contiennent des centres [4Fe4S] (polymérase, hélicase, primase). La fonction de ces Fe-S reste sujette à débat. Un rôle structural a été proposé mais un certain nombre de données suggèrent que dans certains cas leur rôle pourrait être la détection de mutations, notamment dans le cas de XPD (Xeroderma pigmentosum group D-complementing protein). XPD est une hélicase avec une polarité 5'-3' et fait partie du complexe TFIIH (Transcription Factor II Human) impliqué dans la transcription de divers gènes et la réparation par excision de nucléotides d'ADN (Rudolf & al, 2006). XPD lie un centre [4Fe4S] qui est essentiel à son activité hélicase (Rudolf & al, 2006). Il a été proposé qu'en se liant à l'ADN, XPD délivre un électron qui va circuler sur de longues distances via les bases de la double hélice et venir réduire le centre [4Fe4S] d'une autre protéine XPD fixée à un autre endroit de l'ADN, créant ainsi un flux d'électrons à travers l'ADN. Il a été montré qu'XPD a une plus forte affinité pour l'ADN lorsque son centre Fe-S est oxydé, sous forme [4Fe4S]³⁺, que lorsqu'il est réduit, sous forme [4Fe4S]²⁺. Ainsi, si le flux d'électrons est stoppé en raison d'une lésion de l'ADN qui perturbe l'empilement des bases de l'ADN, la protéine XPD va s'accumuler sous forme oxydée et rester fixée à l'ADN (Slinker & al, 2011 ; Kelley & al, 1999),

Introduction bibliographique

permettant ainsi de recruter le complexe TFIIH à la position de la lésion pour initier la réparation du brin d'ADN (Mui & al, 2011 ; Sontz & al, 2012) (**Figure 14**).

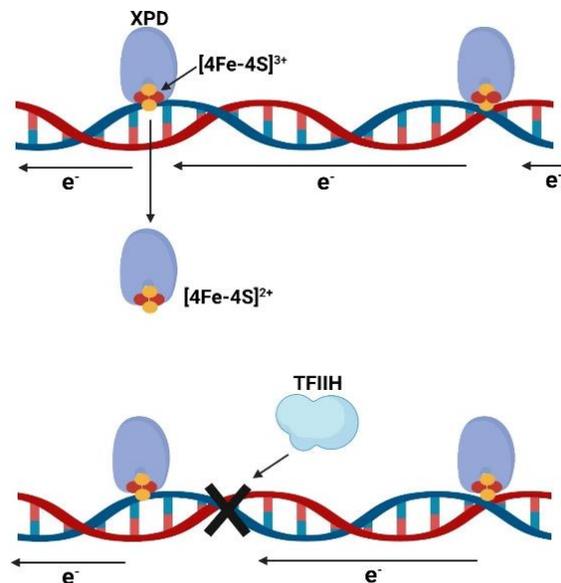


Figure 14 Modèle de détection de dommage à l'ADN par l'hélicase XPD. Différentes protéines XPD peuvent circuler sur un brin d'ADN et donner un électron capable de circuler librement sur le brin d'ADN. Si aucune lésion ou autres modifications n'est présente sur le brin d'ADN, la protéine XPD est réduite par l'électron et se dissocie de l'ADN. A contrario, si une lésion est présente (croix noire sur le schéma du bas) alors XPD n'est pas réduite et reste sur l'ADN et permet le recrutement du complexe TFIIH impliqué dans la réparation de l'ADN. (*Inspiré de Sontz & al, 2012*)

3. La biogénèse des centres Fe-S

Nous allons maintenant aborder le domaine principal de mon sujet de thèse : la biogénèse des centres Fe-S. Des machineries protéiques spécialisées sont apparues très tôt au cours de l'évolution pour assurer l'assemblage de ces centres métalliques. La formation de centres Fe-S est également possible de manière non-enzymatique en présence de trois éléments essentiels : des ions fer, des ions sulfure et une protéine ou molécule d'échafaudage sur laquelle viennent s'assembler les centres Fe-S (Malkin & Rabinowitz, 1966 ; Herskovitz & al, 1972 ; Hagen & al, 1981 ; Beinert & al, 1997). Cependant, la forte réactivité des atomes de fer et de soufre ainsi que leur toxicité a contraint les organismes vivants à développer des machineries spécialisées afin d'orchestrer cette réaction, contrôler la nature des centres Fe-S formés et insérer spécifiquement ces cofacteurs dans les protéines cibles.

Introduction bibliographique

3.1 Les différentes machineries de biosynthèse des centres Fe-S

Plusieurs machineries de biosynthèse des centres Fe-S ont été identifiées dans les trois domaines du vivant avec de forts niveaux de conservation entre les espèces. Le processus de biosynthèse des centres Fe-S est reconnu comme l'un des plus conservés de l'évolution (Lill & al, 2009). Il existe deux grands types de machineries : SUF (**S**U**I**Fur mobilization) et ISC (**I**ron-**S**ulfur **C**luster). Un troisième type de machinerie a été découvert dans les organismes eucaryotes, la machinerie CIA (**C**ytosolic **I**ron-sulfur cluster **A**ssembly), mais elle ne fonctionne pas de manière autonome, elle est dépendante de la machinerie ISC. Une quatrième machinerie, la machinerie NIF (**N**itrogen **F**ixation), très homologue à ISC est présente dans certains organismes où elle est généralement dédiée à l'assemblage des centres [4Fe4S] d'une seule enzyme, la nitrogénase. Il existe un cinquième système, le système CSD (**C**ystéine **S**ulfinate **D**esulfinase) homologue au système SUF, mais qui est incomplet et semble devoir s'associer au système SUF pour fonctionner.

Des études phylogénétiques ont montré que la machinerie SUF est apparue très tôt au cours de l'évolution car il est possible de tracer son apparition jusqu'au dernier ancêtre commun aux trois règnes du vivant (LUCA, **L**ast **U**niversal **C**ommon **A**ncessor) (Boyd & al, 2014). Les archées et la majorité des bactéries ne possèdent que cette machinerie. Inversement, la majorité des eucaryotes ne possède que la machinerie ISC, à l'exception des plantes qui ont conservé les deux machineries, ISC et SUF. La machinerie ISC est également présente dans certains groupes de bactéries ainsi que la machinerie NIF. La machinerie CIA quant à elle, n'est présente que chez les eucaryotes.

Mon travail de thèse s'est concentré sur la machinerie ISC, mais il est intéressant de regarder comment la machinerie SUF a évolué pour comprendre le rôle de chacun de ses composants. À l'origine, elle n'était composée que de deux protéines, SufB et SufC, qui formaient une plateforme d'assemblage sous forme d'un hétérotétramère SufB₂C₂ (Layer & al, 2007 ; Chahal & al, 2012). Il semble que la source de soufre était H₂S qui était très abondant à l'origine de la vie sur Terre. Puis, lorsque la concentration en oxygène a augmenté, il y a environ 2.5 milliards d'années, lors de l'apparition des premiers microorganismes photosynthétiques, deux événements évolutifs majeurs sont survenus. Le premier est l'apparition d'une nouvelle enzyme, une cystéine désulfurase (SufS), qui utilise le soufre de l'acide aminé L-cystéine pour fournir du soufre à SufBC sous forme d'un persulfure lié à une cystéine, de formule Cys-SSH (Pérard & Ollagnier-de-Choudens, 2018). Cette évolution semble liée d'une part à la raréfaction du sulfure d'hydrogène qui s'est retrouvé sous forme de sulfate dans les océans primaires et d'autre part à la nécessité de protéger le processus d'insertion de soufre contre l'oxygène. En parallèle, des systèmes d'assimilation du sulfate comme source principale de soufre ont été mis en place. Le deuxième événement est la duplication de SufB en SufD conduisant à la formation d'un complexe SufBC₂D comme plateforme d'assemblage (Outten & al, 2003 ; Wollers & al, 2010). Ce complexe semble plus résistant à l'oxygène que SufB₂C₂. À la suite de ces événements, d'autres protéines sont

Introduction bibliographique

apparues. La protéine SufE, une protéine relais entre SufS et la plateforme d'assemblage permettant de sécuriser encore plus le processus d'insertion de soufre (Ollagnier-de-Choudens & al, 2003). Une multitude de protéines fonctionnant en aval de ce noyau central (SufB, SufC, SufD, SufS, SufE) sont ensuite apparues, notamment la protéine SufA qui assure la synthèse de centres [4Fe4S] et/ou le transport de centres [4Fe4S] (Chahal & al, 2009 ; Chahal & al, 2012), ainsi que des protéines de transport et une multitude de protéines spécialisées dans l'insertion de centres Fe-S dans certaines protéines cibles. La machinerie SUF de *E. coli* est actuellement composée de 6 gènes : *sufA*, *sufB*, *sufC*, *sufD*, *sufE* et *sufS* sous forme d'un opéron. Le système CSD très homologue à SUF a été découvert chez les bactéries et les plantes. Ce système est uniquement composé d'une cystéine désulfurase CsdA et d'un accepteur de soufre CsdE qui présente une très forte homologie de séquence avec les protéines SufS et SufE (Roche & al, 2013). Cette machinerie serait impliquée dans la biosynthèse des centres Fe-S en apportant le soufre à la machinerie SUF (Trotter & al, 2009).

La machinerie ISC a été initialement découverte chez *Azotobacter vinelandii* et est composée de 8 gènes dans cet organisme : *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA*, *fdx* et *iscX* arrangés en opéron (Zheng & al, 1998). Cette machinerie est retrouvée chez les procaryotes et les eucaryotes avec un certain nombre de spécificités selon les organismes. Dans cet opéron, IscR est un répresseur transcriptionnel qui régule l'expression de l'opéron *isc*. IscR acquiert sa capacité de répresseur transcriptionnel en liant un centre [2Fe2S], ce qui constitue une boucle de rétrocontrôle négative de la quantité de centres Fe-S synthétisés par l'opéron *isc*. IscR n'est pas présente chez les eucaryotes. IscS est la cystéine désulfurase et IscU est la protéine d'échafaudage des centres Fe-S. IscA semble être impliquée dans la biosynthèse des centres [4Fe4S] et aussi le transport de centres [4Fe4S] vers les protéines spécialisées pour l'insertion des centres Fe-S dans les protéines cibles. Fdx est une ferrédoxine à centre [2Fe2S] dont le rôle n'était pas clairement établi lorsque j'ai commencé ma thèse. Les protéines HscA et HscB forment un couple chaperonne/co-chaperonne qui facilite le transfert de centres Fe-S depuis IscU vers les protéines cibles. Enfin, le rôle d'IscX, qui est uniquement présente chez les procaryotes, est également très mal connu.

Les plantes et un certain nombre de bactéries possèdent à la fois les machineries SUF et ISC. Dans les bactéries comme chez *E. coli*, la machinerie SUF n'est exprimée qu'en conditions de carence de fer ou de stress oxydatif (Takahashi & Tokumoto, 2002). Chez les plantes, elle est présente dans le chloroplaste qui est un milieu plus oxydant que la mitochondrie. La machinerie SUF semble donc plus résistante au stress oxydant et possède de meilleures capacités que la machinerie ISC pour mobiliser le fer. Cette efficacité accrue est semble-t-il le résultat de son apparition très précoce qui lui a permis de s'adapter à la pression grandissante en oxygène et la raréfaction du fer biodisponible dû à son oxydation en Fe³⁺.

La machinerie NIF est très homologue à la machinerie ISC. Il s'agit historiquement de la première machinerie de biosynthèse des centres Fe-S découverte (Jacobson & al, 1989). Cette

Introduction bibliographique

machinerie est principalement présente dans la bactérie à Gram négatif diazotrophe *A. vinelandii*, où elle synthétise les centres [4Fe4S] de la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote gazeux N_2 en ammonium NH_4^+ . Le système NIF est également présent dans certaines bactéries incapables de réduire le diazote, comme *Helicobacter pylori* ou *Entamoeba histolytica* dans lesquelles NIF remplace les machineries ISC et SUF comme système de biosynthèse global pour toutes les protéines à centres Fe-S de la cellule (Olson & al, 2000 ; Ali & al, 2004). La machinerie NIF est composée uniquement de deux protéines NifS et NifU (Zheng & al, 1993 ; Fu & al, 1994). NifS est une cystéine désulfurase homologue à IscS (Zheng & al, 1994). NifU est la protéine d'échafaudage des centres Fe-S. C'est une protéine multi-domaines, comprenant un domaine N-terminal homologue à IscU, un domaine central qui lie un centre [2Fe2S] permanent qui pourrait être homologue à celui de la protéine Fdx de la machinerie ISC et enfin un domaine C-terminal homologue aux protéines Nfu qui sont impliquées dans la synthèse et/ou transport des centres [4Fe4S] (Fu & al, 1994). NifU semble donc concentrer plusieurs fonctions en une seule protéine, potentiellement pour permettre la synthèse de centres [4Fe4S] directement sans intermédiaire [2Fe2S].

Chez les eucaryotes, la machinerie CIA assure la synthèse de centres Fe-S pour les protéines présentes dans le cytoplasme et le noyau (**Figure 15**) (Paul & Lill, 2015). Son apparition semble liée à la compartimentation subcellulaire dans ces organismes : les machineries ISC et SUF étant localisées dans la mitochondrie et le chloroplaste, la machinerie CIA permet d'établir un lien entre ces compartiments et le cytoplasme et le noyau. Elle est composée d'au moins 5 protéines qui assurent la biosynthèse des centres Fe-S (NBP35, CFD1, CIAPIN, NDOR1, GLRX3). Cette machinerie est intimement liée à la machinerie ISC mitochondriale. En effet, un défaut de formation de centres Fe-S dans la mitochondrie impacte directement la formation de centres Fe-S dans le cytoplasme. Il a donc été proposé que la machinerie ISC synthétise un composé de nature encore inconnue, appelé composé X, qui est exporté vers le cytoplasme pour permettre la synthèse de centres Fe-S par CIA (**Figure 15**). Le composé X pourrait être soit un centre [2Fe2S], soit un composé soufré.

En résumé, la biosynthèse des centres Fe-S suit un processus similaire pour chaque type de machinerie qui se divise en deux parties : (1) la formation d'un centre Fe-S sur une protéine d'échafaudage et (2) le transfert et le transport du centre Fe-S depuis la protéine d'échafaudage vers les protéines cibles via des protéines spécialisées (Lill, 2009) (**Figure 16**). Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressé à la première étape de ce processus et uniquement par la machinerie ISC, c'est-à-dire la biosynthèse des centres Fe-S sur la protéine d'échafaudage IscU, que je vais maintenant vous présenter plus en détails.

Introduction bibliographique

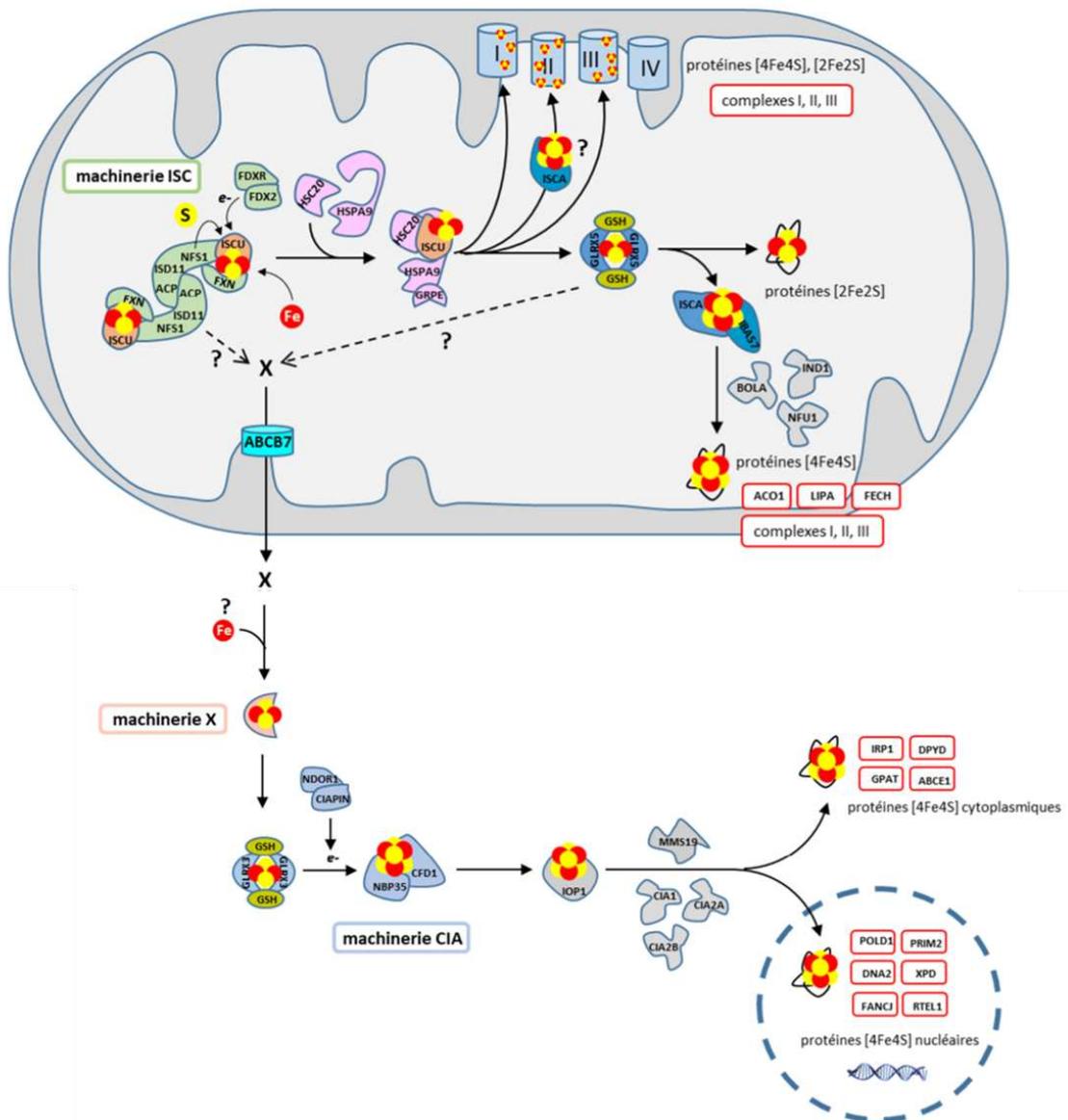


Figure 15 Biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes. La machinerie ISC au sein de la mitochondrie permet la biosynthèse des centres Fe-S pour les protéines mitochondriales et permet l'export d'un composé X nécessaire à la machinerie cytosolique CIA qui fournit les centres Fe-S pour le cytosol et le noyau. (Issue de l'HDR de Benoît D'AUTREAU intitulée *mécanisme de biosynthèse des clusters Fer-Soufre et maladies associées*)

Introduction bibliographique

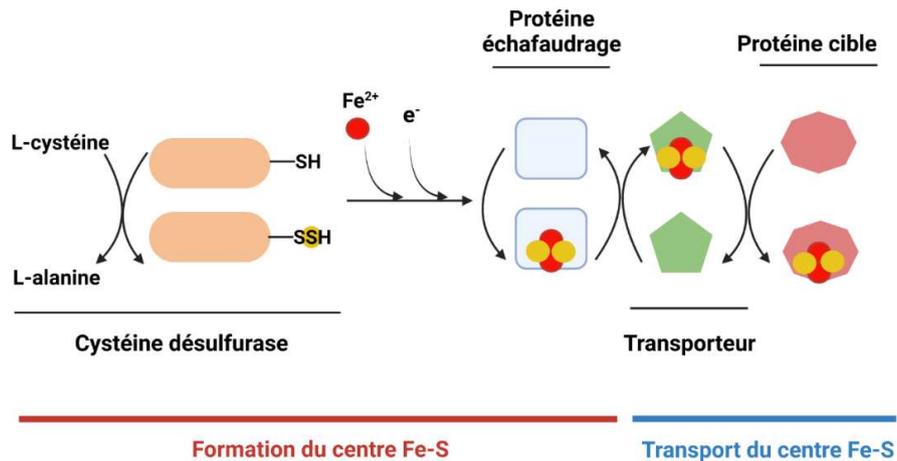


Figure 16 Modèle du principe d'assemblage des centres Fe-S. La biogenèse des centres Fe-S se déroule en deux grandes étapes : (1) la formation du centre Fe-S sur une protéine échafaudage à partir de fer et de soufre fourni par la cystéine désulfurase sous la forme d'un persulfure ; (2) le transport du centre Fe-S via des protéines dédiées vers les protéines cibles. (*Inspiré de Lill, 2009*)

3.2 Description de la machinerie ISC

La machinerie ISC est localisée dans le cytoplasme chez les procaryotes et dans la mitochondrie chez les eucaryotes. Chez ces derniers, elle est héritée d'un ancêtre procaryote absorbé par un organisme eucaryote primitif et qui est à l'origine des mitochondries. Il existe donc une homologie très forte entre les machineries ISC procaryotes et eucaryotes (**voir Tableau 1**). La plupart des gènes composant la machinerie ISC ont été conservés, mais certains ont disparu ou n'ont jamais été acquis, comme IscR et IscX. D'autres protéines ne faisant pas partie de l'opéron *isc* mais impliquées dans la biogenèse des centres Fe-S ont été conservées, notamment la frataxine (CyaY/FXN) et la ferrédoxine réductase (FdxR/FDXR). D'autres protéines sont apparus chez les eucaryotes comme ISD11.

La machinerie ISC étant la seule voie de synthèse des centres Fe-S dans la plupart des organismes eucaryotes et des bactéries où elle est présente, les protéines qui la compose sont généralement essentielles à la viabilité ce qui a compliqué l'étude de leurs fonctions respectives dans l'assemblage. Dans ce contexte, le modèle levure *S. cerevisiae* a été un outil très puissant pour appréhender leurs fonctions en contournant la létalité à l'aide de promoteur régulables permettant de diminuer la quantité de protéine tout en préservant la viabilité. L'étude des maladies associées à un défaut d'assemblage des centres Fe-S a également fortement contribué à la compréhension du processus de biogenèse. En raison du rôle essentiel des centres Fe-S, les maladies touchants les protéines de la machinerie ISC sont rares et sont généralement dues à des mutations dans des introns diminuant l'expression de la protéine et plus rarement des mutations ponctuelles affectant la fonction de la protéine. Elles sont représentées par un nombre extrêmement limité de personnes atteintes, parfois moins d'une dizaine, le plus souvent au sein de fratries, à l'exception de l'ataxie de Friedreich qui est beaucoup plus

Introduction bibliographique

fréquente, nous y reviendrons, mais constituent des objets d'études pour mieux comprendre le rôle de chacun des protagonistes de l'assemblage des centres Fe-S. Je vais maintenant m'attacher à décrire individuellement chaque protéine des machineries ISC avant de décrire l'état des connaissances sur le mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par ce type de machinerie.

Nom	Procaryote	Levure	Mammifère
Protéine échafaudage	IscU	Isu1/2	ISCU
Cystéine désulfurase	IscS	Nfs1	NFS1
Protéine stabilisatrice de la cystéine désulfurase	-	Isd11, Lyrn4	ISD11, LYRM4
Protéine de transport d'acyle	ACP	ACP	ACP
Frataxine	CyaY	Yfh1	FXN
Ferrédoxine	Fdx	Yah1	FDX2
Ferrédoxine réductase	Fenr	Arh1	FDXR
Chaperonne HSP70	HscA	Ssq1	HSPA9
Co-chaperonne	HscB	Jac1	HSC20
Glutaredoxine	Grx4	Grx5	GLRX5
Protéine échafaudage de type A	IscA	Isa1/2	ISCA1/2
Protéine interagissant avec les protéines de type A	-	Iba57	IBA57
Protéine de transfert des centres [4Fe4S]	Bola	Bola1	BOLA1
	-	Bola3	BOLA3
	NfuA	Nfu1	NFU1
	Mrp	Ind1	IND1

Tableau 1 Nom des différentes protéines de la machinerie ISC et facteurs additionnels pouvant s'y associer chez les procaryotes, levures et mammifères.

Introduction bibliographique

3.2.1 La protéine d'échafaudage IscU/ISCU

3.2.1.1 Phénotypes cellulaires

La protéine IscU (ISCU chez les mammifères) est la protéine d'échafaudage des centres Fe-S. Le rôle essentiel d'IscU/ISCU dans l'assemblage des centres Fe-S a été mis en évidence tout d'abord dans la bactérie par le groupe de Denis Dean (Johnson & al, 2006) puis dans la levure par le groupe de Roland Lill. La levure *S. cerevisiae* code pour deux Isu nommées Isu1 et Isu2 homologues de l'IscU des bactéries. La double délétion des gènes *isu1* et *isu2* est létale dans la levure. Cependant, la délétion de l'une ou l'autre Isu restaure la viabilité des levures mais entraîne de nombreux phénotypes tels qu'une forte accumulation de fer au sein de la mitochondrie, une forte diminution de l'activité de l'aconitase qui possède un centre [4Fe4S] et une suppression des dommages oxydatifs sur des levures dépourvues de superoxyde dismutase cytosolique à zinc ou cuivre (Garland & al, 1999 ; Schilke & al, 1999). Ces phénotypes ont mis en évidence qu'Isu1 et Isu2 étaient impliquées dans la biosynthèse des centres Fe-S et que leur rôle n'est pas totalement redondant. Il existe également des homologues d'Isu1 et Isu2 chez les eucaryotes supérieurs, ISCU1 et ISCU2, mais il semble que ISCU1 soit la forme prépondérante pour l'assemblage des centres Fe-S. Un certain nombre de cas de mutations dans le gène codant pour ISCU ont été recensés chez l'homme. La majorité des patients sont homozygotes pour une mutation d'épissage dans l'intron 4 du gène *iscu* entraînant une forte diminution de l'expression de cette protéine (Mochel & al, 2008). Ces mutations conduisent à des myopathies associées à une intolérance sévère à l'effort tout au long de la vie, dans laquelle un effort mineur provoque une fatigue des muscles actifs, un essoufflement et des palpitations cardiaques en association avec une acidose lactique (Larsson & al, 1964 ; Mochel & al, 2008).

3.2.1.2 Structure et fonction

ISCU est hautement conservée chez tous les organismes vivants qui possèdent cette protéine. Il s'agit d'une protéine monomérique de 15 kDa comportant 4 hélices α et 3 feuillets β antiparallèles (**Figure 17**). Des études structurales et spectroscopiques ont mis en évidence qu'ISCU coordonne un centre [2Fe2S] par 3 résidus cystéines strictement conservés Cys35, Cys61, Cys104 (numérotation d'ISCU *M. musculus*) et un quatrième ligand pouvant être soit l'aspartate Asp37 soit l'histidine His103, tous deux également strictement conservés dans les protéines ISCU (Agar & al, 2000 ; Shimomura & al, 2008). Ces résidus cystéines sont également retrouvés dans la partie N-terminale de NifU homologue d'IscU.

La structure cristallographique d'un variant d'ISCU d'*A. aeolicus* dans lequel l'aspartate Asp37 a été substitué par une alanine et qui stabilise la fixation du centre Fe-S, montre un trimère d'ISCU comportant un centre [2Fe2S] coordonné par les trois résidus cystéines et par l'histidine His103 (**Figure**

Introduction bibliographique

17a) (Shimomura & al, 2008). Une structure cristallographique du complexe IscS-IscU d'*A. fulgidus* avec le même type de mutant d'IscU (D37A) montre un centre [2Fe2S] coordonné par 4 résidus cystéines, les 3 résidus cystéines conservés d'IscU et la cystéine catalytique d'IscS (**Figure 17b**) (Marinoni & al, 2012). Les auteurs ont réalisé une étude par mécanique quantique suggérant que la cystéine catalytique d'IscS était un ligand transitoire échangé par la suite par le résidu aspartate Asp37 d'IscU. Dans la protéine sauvage, des études spectroscopiques et par mutagenèse dirigée ont suggéré que le ligand « naturel » est l'aspartate Asp37 (Bonomi & al, 2011). Très récemment la structure d'une protéine IscU sauvage de *Methanotherix thermoacetophila* (archée thermophile) a permis de confirmer l'identité du quatrième ligand du centre [2Fe2S] comme étant Asp37 (Kunichika & al, 2021). Cependant, les études des mutants de l'aspartate suggèrent que ce ligand pourrait être échangeable par His103, ce qui stabiliserait le centre Fe-S au sein d'IscU/ISCU.

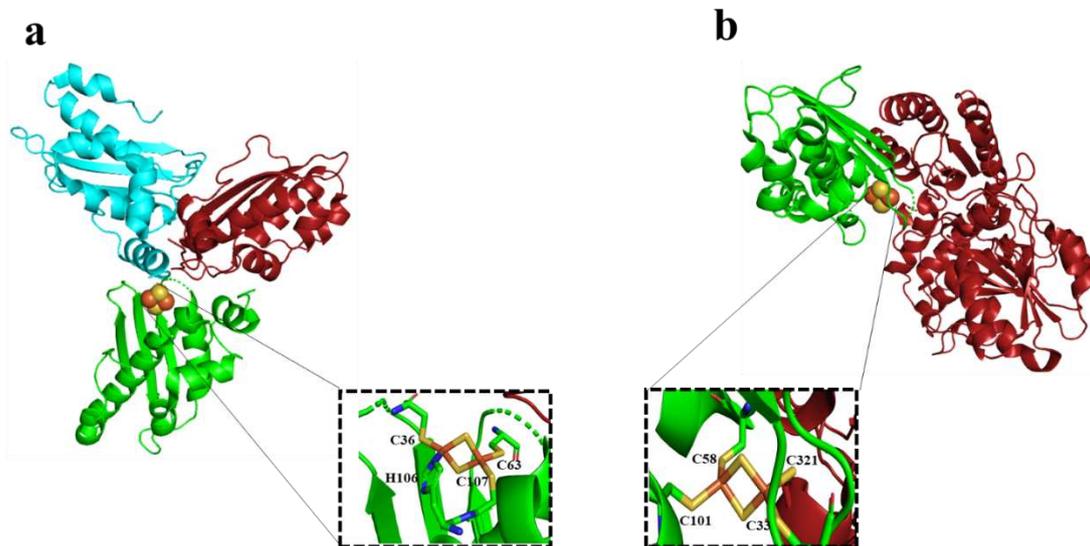


Figure 17 Structure des différents ISCU complexées par un centre [2Fe2S]. (a) Structure cristallographique du trimère d'IscU de *A. aeolicus* avec un centre [2Fe2S] (code PDB : 2z7e). Le centre [2Fe2S] est coordonné par 3 résidus cystéines Cys36, Cys63 et Cys107 et par un résidu histidine His106. (b) Structure cristallographique du complexe IscS-IscU de *A. fulgidus* avec un centre [2Fe2S] (code PDB : 4eb5). Le centre [2Fe2S] est coordonné par 3 résidus cystéines d'IscU Cys33, Cys58 et Cys101 et par un résidu cystéine appartenant à IscS Cys321.

Plusieurs études des protéines IscU/ISCU de différents organismes avant reconstitution du centre Fe-S ont montré la présence de zinc. La structure de la protéine IscU de *Haemophilus influenzae* résolue par RMN a mis en évidence le site de fixation de l'atome de zinc qui prend la place du centre [2Fe2S] dans le site d'assemblage (Ramelot & al, 2004) (**Figure 18a**). Cet atome de zinc est coordonné par les 3 résidus cystéines liant le centre [2Fe2S], Cys35, Cys61 et Cys104 et par le résidu histidine His103. Cet atome de zinc a été retrouvé dans la structure cristallographique du complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU humain (Boniecki & al, 2017). Dans la structure d'ISCU de *M. musculus* résolue par RMN,

Introduction bibliographique

le zinc est coordonné de manière différente, par Cys35 et Cys61, l'aspartate Asp37 et l'histidine His103 (**Figure 18b**). Au final, les différentes coordinations pour le centre [2Fe2S] et pour l'atome de zinc suggèrent une forte plasticité du centre métallique d'ISCU, qui pourrait être une caractéristique importante de cette protéine pour permettre l'insertion séquentielle de soufre et de fer conduisant à la formation d'un centre Fe-S. La présence d'un atome de zinc dans IscU/ISCU a amené un certain nombre de questions sur son rôle potentiel et la possibilité d'insérer du fer, mais il a également été proposé que cela pourrait être dû à un artefact de purification car de grandes quantités de zinc sont libérées au cours de la lyse des cellules pour extraire les protéines purifiées. Lorsque j'ai débuté ma thèse aucune forme d'IscU liant du fer dans son état initial avant assemblage n'avait été caractérisée.

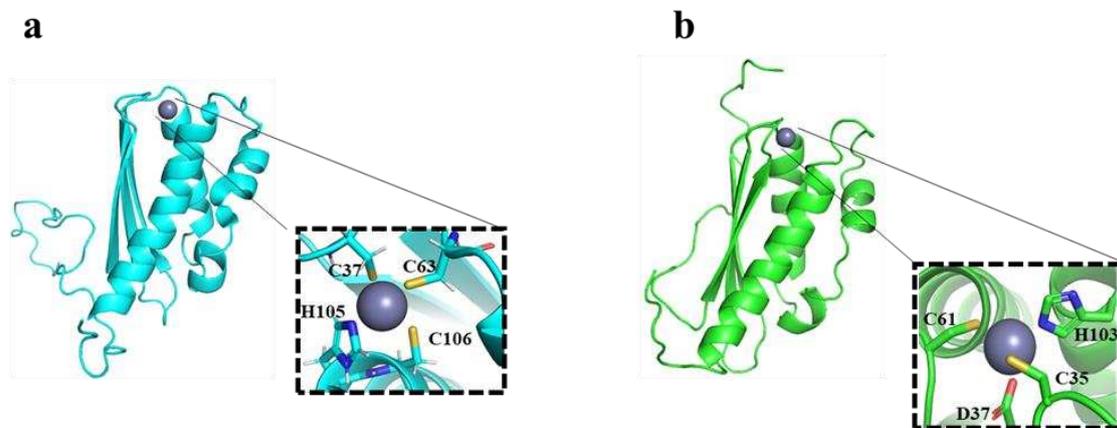


Figure 18 Structure de la protéine échafaudage ISCU liant un atome de zinc de deux organismes différents. (a) Structure de IscU de *H. influenzae* (cyan) résolue par spectroscopie RMN (code PDB : 1r9p). La protéine IscU lie un atome de zinc dans son site catalytique coordonné par trois résidus cystéines et par un résidu histidine. (b) Structure de ISCU de *M. musculus* (vert) résolue par spectroscopie RMN. La protéine ISCU lie un atome de zinc dans son site catalytique coordonné par deux résidus cystéines et un résidu histidine et aspartate.

Des études par RMN ont montré qu'IscU sous forme apo-protéine (c'est-à-dire sans métal) existe en solution sous deux formes en équilibre, une forme structurée (S) et une forme déstructurée (D) (Kim & al, 2009). En présence de zinc ou de fer la forme S est stabilisée (**Figure 19c**) (Kim & al, 2012 ; Kim & al, 2012, Iannuzzi & al, 2014). L'effet structurant du métal s'explique par la distribution spatiale des ligands qui forment le site de fixation du métal. Ces acides aminés sont portés par des éléments de structure secondaire très éloignés les uns des autres (**Figure 19a**). Cys35 et Asp37 sont situés au niveau d'une épingle de feuillet β (β hairpin), Cys61 est portée par un linker reliant un feuillet β et une hélice α et Cys104, His103 sont portés par une autre hélice α (**Figure 19a**). La fixation du métal permet le rapprochement de différentes structures secondaires et donc stabilise la forme S d'ISCU. L'équipe du Dr. John L. Markley (Madison, USA) a montré que certains mutants favorisent l'une des deux formes en absence de métal (Kim & al, 2012). Les mutants de l'aspartate Asp37 en résidus hydrophobes: D37V, D37L et D37A ainsi que les mutants N88A, S105A et E109A stabilisent la forme S (**Figure 19b**). Cette

Introduction bibliographique

stabilisation s'explique probablement par la création d'interactions hydrophobes « non naturelles » entre différentes régions de la protéine. Inversement, les mutants K87A et N88D, stabilisent la forme D d'ISCU. Cela suggère que K87 forme un pont salin important pour la structuration de la forme S. Par contre, l'effet inverse des mutations N88A et N88D demeure une énigme.

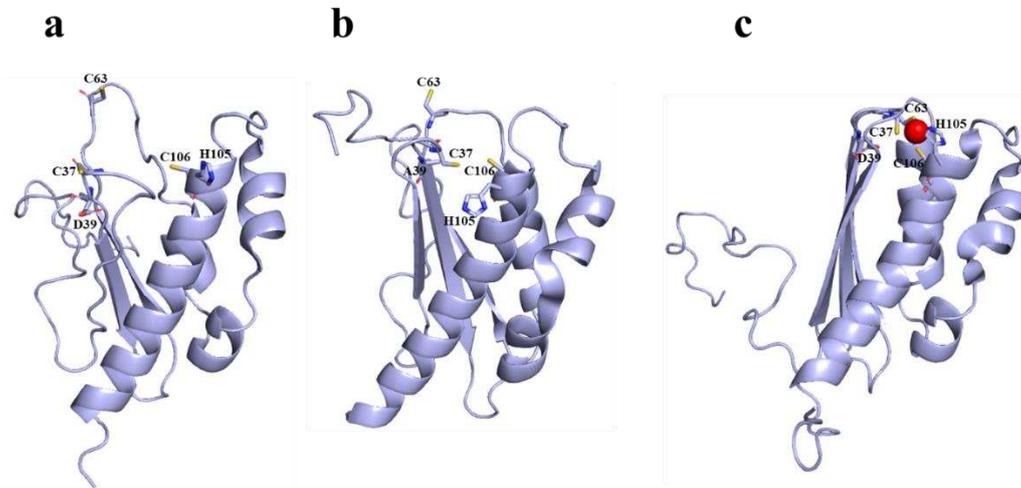


Figure 19 Structure de la protéine échafaudage ISCU sous différents états de repliement. (a) Structure de IscU d'*E. coli* résolue par spectroscopie RMN (code PDB : 2l4x). La protéine IscU se trouve principalement sous une forme D sans son métal. Les éléments liant le métal se trouvent sur des structures secondaires différentes notamment des boucles flexibles qui favorisent cette forme D. (b) Structure de IscU D37A d'*E. coli* résolue par spectroscopie RMN (code PDB : 2kqk). Ce mutant IscU D37A favorise la forme S en diminuant la flexibilité des boucles contenant les résidus liant le métal. (c) Structure de IscU de *H. influenzae* résolue par spectroscopie RMN (code PDB : 1r9p). La protéine IscU lie un atome de zinc dans son site catalytique coordonné par les trois résidus cystéines et par un résidu histidine permettant le rapprochement des structures secondaires afin de stabiliser la forme S.

3.2.2 Les cystéines désulfurase IscS et NFS1

3.2.2.1 Phénotypes cellulaires

La délétion des gènes *iscS* chez *A. vinelandii* et de son homologue *nfs1* chez *S. cerevisiae*, codant pour la cystéine désulfurase (CD) de la machinerie ISC, sont létales (Zheng & al, 1998 ; Li & al, 1999). Chez *E. coli*, la délétion du gène *iscS* est viable en raison de la présence de la machinerie SUF qui prend le relais (Schwartz & al, 2000). Mais cette délétion engendre tout de même un phénotype de défaut de synthèse de centres Fe-S, ce qui montre que les machineries ISC et SUF ne sont pas totalement redondantes fonctionnellement. Des déficiences en NFS1 ont également été référencées chez l'homme, qui conduisent à des déficits en complexes II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale lié à la mutation ponctuelle Arg72Glu dans NFS1 (Farhan & al, 2013 ; Lim & al, 2013). Cependant, ces défauts ne sont peut-être pas uniquement liés à un déficit en centres Fe-S car les CD NFS1 et IscS sont source de soufre non seulement pour la biosynthèse des centres Fe-S mais également pour la thiolation des

Introduction bibliographique

ARN de transfert, la synthèse de thiamine, de NAD et du cofacteur à molybdène via les protéines ThiI et TusA chez les procaryotes et TUM1 et MOCS3 chez les eucaryotes (Black & Dos Santos, 2015).

3.2.2.2 Structure et fonction

Les CD sont des enzymes d'environ 45 kDa appartenant à la famille des enzymes à phosphate de pyridoxal (PLP), un cofacteur qui permet de réaliser des réactions de transamination et de décarboxylation des acides aminés. Dans le cas de IscS/NFS1, le PLP intervient dans la désulfuration de la L-cystéine conduisant à la formation d'un persulfure sur une cystéine conservée, appelée cystéine catalytique (**Figure 20**).

Ces enzymes sont capables de transférer le soufre sous forme persulfure grâce à une boucle flexible portant cette cystéine catalytique. Les CD sont classées en deux groupes selon la taille de cette boucle flexible (Black & Dos Santos, 2015). Les CD avec les plus grandes boucles sont regroupées dans le groupe I qui contient NFS1, IscS et NifS et les autres dans le groupe II qui contient notamment SufS. Cependant, le mécanisme par lequel ces enzymes forment leur persulfure est identique (**Figure 20**). Le cofacteur PLP est lié à l'enzyme par une lysine formant une liaison aldimine et il est stabilisé par de nombreuses liaisons hydrogène ainsi que de nombreux résidus polaires facilitant l'accès du substrat. La L-cystéine se lie au cofacteur PLP en prenant la place du résidu lysine en formant une liaison aldimine (**réaction 1**). Cet intermédiaire se réarrange en ketimine par la formation d'une double liaison entre le carbone α de la cystéine et l'azote de la lysine (**réaction 2**). La cystéine catalytique de la CD est ensuite déprotonée par une base, ce qui permet une attaque nucléophile du thiolate sur le soufre de l'intermédiaire ketimine avec la L-cystéine, générant ainsi un persulfure (**réaction 3**). L'autre produit de la réaction est la formation d'une double liaison entre les carbones α et β (intermédiaire alanine-énamine) qui est ensuite protoné pour conduire au final à un intermédiaire alanine-aldimine après réarrangement (**réactions 4 et 5**). De la L-alanine est ensuite relarguée et la lysine de l'enzyme se relie à nouveau au cofacteur PLP (**réaction 6**). Le soufre terminal du persulfure est également appelé soufre « sulfane » et de manière récurrente il est considéré comme étant à l'état redox 0 tandis que le soufre adjacent resterait lui à l'état -II. En réalité lorsque deux atomes identiques sont liés par une liaison covalente et sont plus électronégatifs que leurs voisins, ils partagent leurs électrons, comme dans les peroxydes (ROOR') et les ponts disulfures dans lesquels les deux atomes d'oxygène et de soufre sont au degré -I. Ainsi, au cours de la réaction de formation du persulfure, les degrés d'oxydation du soufre de la L-cystéine et de la cystéine catalytique de la CD sont tous deux modifiés ; ils passent de l'état -II dans leur forme thiol de départ à l'état -I dans le persulfure. Le persulfure porté par la cystéine catalytique peut ensuite être transféré à un autre thiol par une réaction de transpersulfuration qui est formellement une attaque nucléophile du thiolate accepteur sur le soufre sulfane (**réaction 6**). Le bilan redox de cette réaction est nul car le sulfane conserve son degré d'oxydation et les sulfures porteurs sont

Introduction bibliographique

symétriquement oxydés et réduits, il n'y a donc pas besoin d'apport externe en électron pour cette réaction.

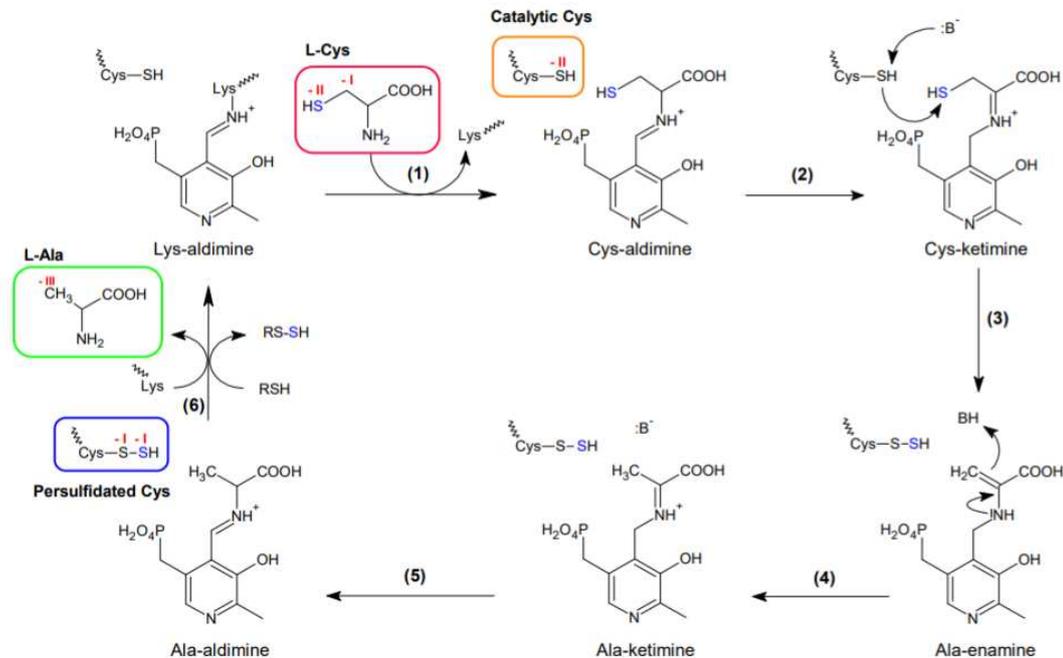


Figure 20 Mécanisme de formation du persulfure sur les CD. Le cofacteur PLP est lié à une lysine de la CD sous la forme d'une Lys-aldimine. La L-cystéine (en rouge) va se lier au cofacteur PLP en prenant la place de la lysine sous la forme d'une Cys-aldimine (1), qui est réarrangée en Cys-ketimine (2). La cystéine catalytique de la CD (en orange) est déprotonée permettant son attaque nucléophile sur la Cys-ketimine pour générer un persulfure (en bleu) (3). La formation d'une double liaison entre le carbone α et β de l'intermédiaire Cys-ketimine permet de générer un intermédiaire Ala-énamine (3) puis une protonation permet de générer une Ala-ketimine (4) puis une Ala-aldimine (5). À la fin de la réaction, le persulfure est formé sur la cystéine catalytique et une molécule de L-alanine est relarguée (6). (Issue de Srouf & al, 2020)

Chez les eucaryotes, NFS1 est en complexe avec deux petites protéines : ISD11 et ACP (Acyl Carrier Protein) qui forment elles-mêmes un complexe ISD11-ACP entre elles via un acide gras porté par ACP (Boniecky & al, 2017 ; Cory & al, 2017). Des cas de mutations affectant ISD11 ont été recensées chez l'homme qui conduisent à des déficiences infantiles des complexes II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'agit de la mutation Arg72Glu dans NFS1 empêchant la liaison avec ISD11 et la mutation Arg68Leu dans ISD11 empêchant la formation du complexe NFS1-ISD11 (Farhan & al, 2013 ; Lim & al, 2013). Ces données indiquent donc qu'ISD11 joue un rôle essentiel pour la fonction de NFS1. Des études dans la levure *S. cerevisiae* ont également montré qu'Acp et Isd11 étaient requises pour une activité optimale de Nfs1 (Wiedemann & al, 2006). ISD11 fait partie de la famille des protéines LYR uniquement présentes chez les eucaryotes qui tirent leur nom d'un motif canonique Leu-

Introduction bibliographique

Tyr-Arg (LYR) caractéristique. La levure *S. cerevisiae* possède 4 autres protéines LYR : Sdh6, Sdh7, Mzm1 et Fmc1 qui sont impliquées dans l'assemblage des complexes respiratoires II, III et V (Adam & al, 2006 ; Atkinson & al, 2011 ; Lefebvre-Legendre & al, 2001 ; Na & al, 2014). Chez les mammifères, la famille des protéines LYR est plus vaste. On retrouve 4 orthologues de Sdh6, Sdh7, Mzm1 et Isd11, les sous-unités NB4M et NDUFA6 qui interagissent avec le complexe I (Angerer & al, 2014), LOR8F8 régulateur de la biogenèse des ribosomes mitochondriaux (Brown & al, 2017) et plusieurs autres protéines LYR aux fonctions encore inconnues. Les protéines LYR interagissent directement avec ACP, une protéine mitochondriale de transport d'acyle qui est un composant essentiel de la voie de synthèse des acides gras (mtFAS) dans la mitochondrie (Angerer, 2015 ; Hiltunen & al, 2010). L'initiation et l'élongation des chaînes acyles par mtFAS emploient différentes enzymes qui interagissent toutes de manière transitoire avec ACP, qui elle fonctionne comme une protéine d'échafaudage pour la synthèse des acides gras. ACP possède un groupement prosthétique appelé 4'-phosphopantéthéine (4'-PP) lié de façon covalente à un résidu sérine fournissant le thiol sur lequel les acides gras sont synthétisés (Stuible & al, 1998). L'acide gras intermédiaire acyl-ACP comportant 8 atomes de carbone préalablement synthétisés par la mtFAS permet la biosynthèse de l'acide lipoïque qui est un cofacteur important pour de nombreuses protéines mitochondriales (Brody & al, 1997). Des études biochimiques *in vitro* ont mis en évidence que mtFAS permettait la formation d'acide gras comportant plus de 8 atomes de carbone sur ACP qui sont impliqués dans un processus de régulation (Zhang & al, 2005). Une étude récente a montré que la régulation de la biosynthèse des acides gras est directement liée à la régulation de la chaîne respiratoire (Van Vranken & al, 2018). En effet, lorsque la concentration en acétyl-CoA diminue, la production d'acides gras sur ACP est également diminuée, conduisant à une diminution de l'assemblage des différents complexes de la chaîne respiratoire comportant des protéines LYR, s'accompagnant d'une diminution de la synthèse de centres Fe-S et une respiration mitochondriale fortement réduite. L'interaction entre ISD11 et ACP semble donc essentielle pour la synthèse de centres Fe-S.

L'interaction entre ACP et ISD11 se fait notamment via la chaîne d'acides gras d'ACP comportant entre 12 et 16 carbones (Boniecky & al, 2017 ; Cory & al, 2017). Il semble que la fixation d'ACP à ISD11 via cette chaîne d'acide gras soit essentielle pour stabiliser ISD11, qui est insoluble seule ; de même la fixation du complexe ISD11-ACP à NFS1 sert à stabiliser cette dernière qui est très peu soluble seule (Van Vranken & al, 2016 ; Yan & al, 2016 ; Herrera & al, 2019). En effet, le complexe Nfs1-Isd11 est déstabilisé lorsque le résidu sérine d'ACP portant le 4'-PP est muté ou lorsque le gène *ppt2* codant pour la 4'-PP transférase est invalidé (Van Vranken & al, 2016). De plus, l'inactivation de l'ACP mitochondriale dans des cultures de myoblastes déstabilise la machinerie d'assemblage des centres Fe-S (Van Vranken & al, 2016). Cette étude montre également qu'un défaut de biosynthèse de l'acide lipoïque n'a aucun effet sur la formation des centres Fe-S alors qu'un défaut d'acylation d'ACP affecte la biosynthèse des centres Fe-S (Van Vranken & al, 2016).

Introduction bibliographique

Les structures des CD ont montré que ces protéines sont des homodimères. Étonnamment, deux structures cristallographiques du complexe NFS1-ISD11-ACP ont été déterminées avec deux conformations différentes (Boniecky & al, 2017 ; Cory & al, 2017). Une structure avec une conformation dite « fermée » où les deux sous-unités NFS1 complètent le site de fixation du PLP (**Figure 21a**) (Boniecki & al, 2017 ; Nakamura & al, 2020). Cette conformation « fermée » est similaire à celle obtenue avec IscS (**Figure 21b**) (Cupp-Vickery & al, 2003). La seconde structure montre une conformation dite « ouverte » dans laquelle l'arrangement des deux sous-unités NFS1 ne permet plus de compléter le site de fixation du PLP et est donc considérée comme inactive, mais cela n'a pas encore pu être démontré car il n'est pas possible aujourd'hui d'isoler l'une ou l'autre des conformations en solution (**Figure 21c**) (Cory & al, 2017). Dans la conformation « fermée », l'interface de dimérisation est principalement constituée par les deux sous-unités NFS1. Dans la conformation « ouverte » cette surface de dimérisation NFS1-NFS1 est beaucoup plus réduite car la dimérisation est également assurée des interactions entre ISD11 et NFS1. ISD11 semble donc jouer un rôle essentiel dans la stabilité de cette conformation « ouverte ».

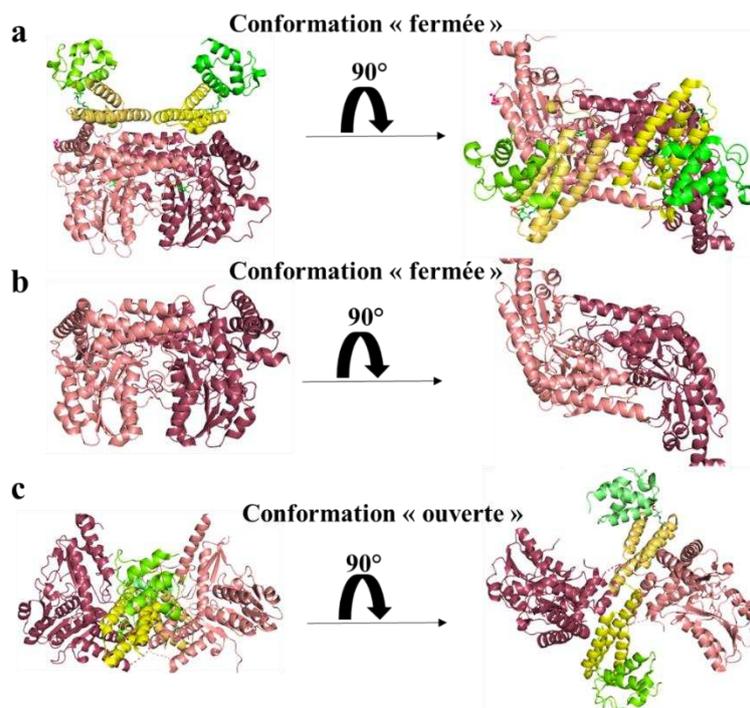


Figure 21 Structure des différentes conformations de la CD humaine NFS1-ISD11-ACP. (a) Structure cristallographique du complexe NFS1-ISD11-ACP dans sa conformation « fermée » (code PDB : 5wgb). L'interface de dimérisation est principalement due aux NFS1 sans contact entre les ISD11-ACP. Les poches contenant les PLP sont dites complètes suggérant une forme active. (b) Structure cristallographique du dimère d'IscS (code PDB : 1p3w). La conformation d'IscS est similaire à la conformation « fermée » du complexe NFS1-ISD11-ACP. (c) Structure cristallographique du complexe NFS1-ISD11-ACP dans sa conformation « ouverte » (code PDB : 5usr). L'interface de dimérisation semble faire intervenir les deux ISD11. Les poches contenant les PLP sont incomplètes

Introduction bibliographique

suggérant une forme inactive de NFS1. Les NFS1 sont en rose clair et foncé, ISD11 en jaune clair et foncé et ACP en vert clair ou foncé.

3.2.3 La ferrédoxine Fdx/FDX2

3.2.3.1 Phénotypes cellulaires

L'opéron *isc* code pour une ferrédoxine (Fdx) qui a été conservée chez les eucaryotes (Johnson & al, 2005 ; Tagawa & al, 1962). Cette ferrédoxine possède un centre [2Fe2S] et reçoit ses électrons d'une flavine-réductase, FdxR, qui elle ne fait pas partie de l'opéron *isc*. FdxR utilise le NADPH comme source d'électrons pour réduire le centre [2Fe2S] de la Fdx (Kurisu & al, 2001). Les délétions du gène de la ferrédoxine *fdx* chez *A. vinelandii* ou de son homologue *Yah1* chez *S. cerevisiae* sont létales, indiquant ainsi que ces protéines sont essentielles à la synthèse des centres Fe-S. La déplétion de Fdx dans des cellules de levures à l'aide d'un promoteur réglable, entraîne une forte diminution de la formation des centres Fe-S, ce qui confirme leur rôle prépondérant dans la biosynthèse des centres Fe-S (Lange & al, 2000 ; Johnson & al, 2006). Chez *E. coli*, la délétion du gène *fdx* est viable probablement en raison de la présence de la machinerie SUF qui prend le relais (Tokumoto & Takahashi, 2001). Mais cette délétion engendre tout de même un phénotype de défaut de synthèse de centres Fe-S ce qui confirme que cette protéine est directement impliquée dans la biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC. Chez l'homme, il y a deux ferrédoxines, FDX1 principalement localisée dans les glandes surrénales et FDX2 présente dans tous les tissus. FDX1 est principalement impliquée dans la synthèse de stéroïdes alors que FDX2 est impliquée dans la formation des centres Fe-S dans la mitochondrie (Sheftel & al, 2010). Des cas de patients présentant une déficience en FDX2 ont été recensés. Il s'agit de mutations dans le codon d'initiation ATG provoquant l'interruption de l'expression de FDX2 (Spiegel & al, 2014). Ces mutations conduisent à des myopathies associées à une intolérance sévère à l'exercice, de la fatigue, de la tachycardie ainsi que de fortes douleurs dans les muscles (Larsson & al, 1964 ; Mochel & al, 2008).

Il est important de noter que la délétion du gène *arh1*, le partenaire de Fdx, est également léthal chez *S. cerevisiae* soulignant toute l'importance de ce couple pour la synthèse de centres Fe-S et l'absence de redondance (Manzella & al, 1998). Des mutations au sein de FDXR (Arg242Trp ; Arg306Cys ; Leu215Val) ont été récemment observées chez de jeunes patients développant des neuropathies sensorielles accompagnées de surdité et/ou d'atrophie optique (Paul & al, 2017). Dans la levure *S. cerevisiae*, la surexpression de FDXR humaine dans des souches où le gène de la ferrédoxine réductase *arh1* a été supprimé, permet de restaurer la viabilité. Les auteurs ont ainsi pu tester les mutations cliniques dans la FDXR humaine, chez *S. cerevisiae*. La mutation Arg242Trp n'est pas capable de restaurer une croissance cellulaire normale suggérant une perte de fonctionnalité de la FDXR.

Introduction bibliographique

Les mutations Arg306Cys et Leu215Val ne modifient pas la croissance cellulaire mais diminuent drastiquement l'activité de l'aconitase suggérant une déficience en centres Fe-S (Paul & al, 2017).

3.2.3.2 Structure et fonction

Fdx est une petite protéine d'environ 15 kDa capable de transférer un électron grâce à son centre [2Fe2S] qui existe dans les états 2+ et 3+. La structure cristallographique de Fdx d'*E. coli* montre que cette protéine possède une structure tertiaire composée de 5 feuillets β et de 3 hélices α reliées entre eux par des boucles flexibles (**Figure 22a**) (Kakuta & al, 2001). Le centre [2Fe2S] est partiellement exposé au solvant. Il est coordonné par les 4 résidus cystéines conservés : Cys42, Cys48, Cys51 et Cys87. De plus, Fdx possède deux domaines acides composés de nombreux résidus glutamate et aspartate correspondant aux domaines d'interactions avec la réductase FdxR et potentiellement d'autres partenaires. La structure cristallographique de FDX2 humaine présente une architecture similaire avec néanmoins 2 hélices α supplémentaires (**Figure 22b**). Le rôle exact de cette protéine dans l'assemblage des centres Fe-S était inconnu lorsque j'ai débuté ma thèse mais plusieurs travaux ont mis en évidence son interaction avec différentes protéines de l'opéron *isc* dont IscS, IscA et HscA (Ollagnier-de-Choudens & al, 2001 ; Tokumoto & al, 2002 ; Kim & al, 2013). L'équipe d'Annalisa Pastore a montré par spectroscopie RMN, SAXS et BLI (**BioLayer Interferometry**) qu'IscS interagit spécifiquement avec la forme holo-Fdx par le biais d'interactions électrostatiques (Yan & al, 2013). Le site de fixation de Fdx étant très proche de la boucle flexible d'IscS, les auteurs ont également proposé que Fdx soit capable de réduire le persulfure d'IscS. Le transport d'électron serait médié par le résidu Tyr103 ou His107 de Fdx. Les auteurs ont également montré que le site de fixation de Fdx sur IscS est en compétition avec les sites de fixation de la frataxine bactérienne CyaY et de IscX mais pas celui d'IscU. Cependant, l'équipe de John L. Markley a montré par spectroscopie RMN que la fixation de Fdx sur IscS induit la dissociation de IscU (Kim & al, 2013). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel Fdx fournit un électron au persulfure d'IscS sous la forme d'un anion radicalaire persulfure qui est par la suite transféré à IscU (Kim & al, 2013). Une étude SAXS plus récente sur le complexe ISC de *C. thermophilum* a montré que Fdx interagit avec le complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN (NIAUF) au niveau d'un site de fixation différent de celui de FXN (Boniecki & al, 2017). Dans ce modèle, le centre [2Fe2S] de Fdx est très proche du site d'assemblage des centres Fe-S d'ISCU, suggérant plutôt un transfert d'électrons à IscU. Au début de ma thèse, la cible primaire de Fdx/FDX2, IscS/NFS1 ou IscU/ISCU, étant donc une question ouverte.

Introduction bibliographique

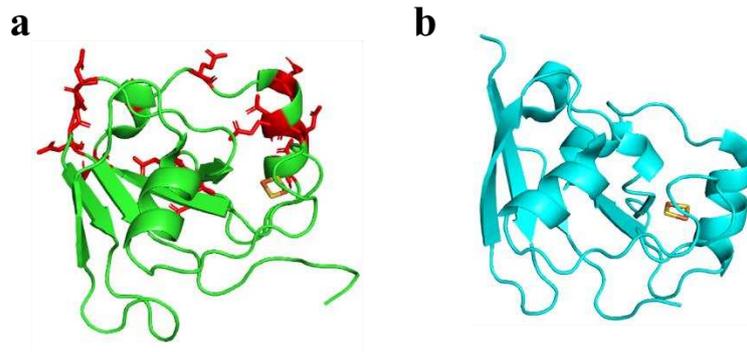


Figure 22 Structure de Fdx d'*E. coli* et de FDX2 humaine. (a) Structure cristallographique de Fdx provenant d'*E. coli* (code PDB : 1i7h). Les résidus en rouge représentent les résidus des deux régions acides impliquées dans l'interaction avec la réductase et ces autres partenaires (b) Structure cristallographique de FDX2 humaine (code PDB : 2y5c).

3.2.4 La frataxine

3.2.4.1 Phénotypes cellulaires

L'implication de la frataxine dans la biosynthèse des centres Fe-S a été découverte par le biais d'une maladie humaine, l'ataxie de Friedreich, qui est causée par des mutations dans le gène codant pour cette protéine (voir paragraphe suivant). Un homologue bactérien, CyaY, a ensuite été identifié. La raison pour laquelle CyaY n'avait pas été découverte en premier est qu'elle ne fait pas partie de l'opéron *isc*. Les études phylogéniques ont ensuite montré que la frataxine est présente chez les eucaryotes et certaines bactéries à Gram-négatif, mais elle est absente des archées et des bactéries à Gram-positif (Gibson & al, 1996). Il semble donc que la frataxine ne soit pas une protéine essentielle à l'assemblage des centres Fe-S, car elle n'est pas conservée dans tous les organismes.

Lorsque le gène muté dans l'ataxie de Friedreich a été identifié en 1996, la fonction de la frataxine était inconnue. Cependant, assez rapidement, les phénotypes cellulaires liés au déficit ou à l'absence de frataxine ont mis en évidence un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer (Foury & Cazzalini, 1997 ; Puccio & al, 2001). Les principaux phénotypes sont un déficit en centres Fe-S et en hèmes, une accumulation de fer dans les mitochondries et une sensibilité accrue au stress oxydant. Les modèles levures ont confirmé l'importance de la frataxine (Yfh1 dans la levure) dans le métabolisme du fer. Chez les procaryotes, cependant, les phénotypes sont moins prononcés. Dans des souches *E. coli* et *S. enterica* cultivées dans des conditions standards, aucun phénotype de croissance n'avait été observé en absence de CyaY (Li & al, 1999 ; Vivas & al, 2006 ; Roche & al, 2005). Cependant, dans certaines conditions plus spécifiques, des phénotypes de croissance et de défaut de synthèse de centres Fe-S sont présents. Chez *S. enterica*, ces phénotypes sont révélés lorsque la protéine YggX est également absente (Vivas & al, 2006). La fonction de YggX n'est pas connue mais semble liée au métabolisme du fer. Chez *E. coli*, un phénotype est observé dans des expériences de co-culture avec une souche sauvage

Introduction bibliographique

(Roche & al, 2015). Les mesures d'activité de différentes enzymes à centres Fe-S effectuées chez *E. coli* montrent une réduction significative, d'environ 50 %, de la quantité de centres Fe-S qui permet d'expliquer ces phénotypes (Roche & al, 2015). De plus, les expériences menées avec des souches invalidées pour l'opéron *suf* ont montré que CyaY interagit spécifiquement avec la machinerie ISC pour la synthèse de centres Fe-S mais pas avec la machinerie SUF. Enfin, dans cette étude il a été montré que le défaut de biosynthèse des centres Fe-S est dépendant du fer. En milieu pauvre M9, le défaut de biosynthèse des centres Fe-S est beaucoup moins marqué voire totalement absent, tandis qu'il est clairement visible en milieu riche (LB) et en milieu M9 supplémenté en fer (Roche & al, 2015). Globalement, l'ensemble de ces études montre un rôle important, mais non-essentiel, de la frataxine aussi bien eucaryote que procaryote dans la biosynthèse des centres Fe-S.

3.2.4.2 L'ataxie de Friedreich

Alors que les maladies humaines causées par des mutations dans les gènes codant pour les protéines de la machinerie ISC sont très rares, voir extrêmement rares, l'ataxie de Friedreich est beaucoup plus fréquente (prévalence de l'ordre de 1 naissance sur 25 000 à 50 000 dans les populations caucasiennes), ce qui a fortement stimulé la recherche de traitement contre cette maladie (Campuzano & al 1996). L'ataxie de Friedreich tire son nom du neurologue Nicolas Friedreich qui a été le premier à décrire cette maladie en 1863 (Friedreich, 1863). L'ataxie de Friedreich est une maladie génétique s'attaquant principalement au cervelet d'où le nom de maladie neurodégénérative, mais aussi au cœur et au foie. Cette atteinte tissu-spécifique semble corrélée au niveau d'expression plus élevé de la frataxine dans ces tissus ainsi qu'à une demande énergétique plus importante qui rend ces organes plus dépendants des enzymes Fe-S et hémiques et donc de la frataxine (Koutnikova & al, 1997). Cette maladie engendre dans un premier temps des troubles de l'équilibre et de la coordination (ataxie) dus à une neurodégénérescence du cervelet et de la voie spinocérébelleuse, puis une atteinte cardiaque conduisant à une hypertrophie du cœur. Les patients atteints peuvent parfois présenter des troubles ostéo-articulaires et un diabète de type I. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement entre 7 et 14 ans. Il est très rare que cette maladie apparaisse après 20 ans (Filla & al, 1990). C'est une maladie caucasienne touchant autant les femmes que les hommes et que l'on retrouve peu ou pas en Afrique et en Asie (Labuda & al, 2000).

La découverte en 1996 des anomalies génétiques responsable de l'ataxie de Friedreich a permis de faire des corrélations entre génotypes et phénotypes (Campuzano & al, 1996). Cette maladie est due à une expansion anormale de triplet GAA situé dans l'intron 1 du gène de la frataxine porté par le chromosome 9 (Puccio & Koenig, 2000). Cette expansion anormale peut s'étendre de 70 à 2000 répétitions de triplet GAA alors que chez un patient sain cette expansion n'excède pas 40 répétitions. Dans la plupart des cas (97 %) les patients sont homozygotes, avec les deux allèles touchés par cette

Introduction bibliographique

expansion anormale. Dans de rares cas (3 %) les patients sont hétérozygotes, un allèle possède l'expansion anormale alors que l'autre allèle possède des mutations ponctuelles ou des délétions. Dans les deux cas, on observe une inhibition de la transcription du gène de la frataxine se traduisant par une forte diminution de l'expression de cette protéine de l'ordre de 75 à 95 %.

Il est important de noter qu'une quarantaine de mutations sur des résidus conservés ont été recensées dans la FXN chez les patients atteints de l'ataxie de Friedreich. Ces mutations peuvent être des insertions, des substitutions ou bien des délétions d'un à plusieurs nucléotides. Ces mutations engendrent d'une part des non-sens, des délétions d'exons, des décalages du cadre de lecture ou bien des erreurs dans l'épissage ayant pour conséquence une troncation importante de la FXN ou bien l'absence totale de FXN (Lynch & al, 2012). D'autre part, ces mutations provoquent des faux-sens affectant la stabilité et la fonctionnalité de la FXN (Schmucker & al, 2011). Les mutations L106S, D122Y, G130V, N146K, R165C, L182F sont liées à des formes moins sévères de la maladie (Zühlke & al, 2004). Les mutations I154F, W155F/A/R présentent des formes extrêmement sévères de la maladie.

La diminution de l'expression de la frataxine se traduit par une déficience de l'activité des protéines héminiques et des enzymes à centre Fe-S aussi bien dans la mitochondrie que dans le cytoplasme, ce qui indique que la frataxine contrôle la production des centres Fe-S de la mitochondrie et du composé X (Rötig & al, 1997 ; Puccio & al, 2001). S'ajoute à ce phénotype, une accumulation de fer dans la mitochondrie ainsi qu'une sensibilité accrue au stress oxydatif (Puccio & al, 2001 ; Bradley & al, 2004). Ce faisceau de phénotypes a rendu l'élucidation de sa fonction biochimique très complexe et a conduit à de nombreuses controverses que nous allons détailler par la suite.

3.2.4.3 Localisation, maturation et structure

La frataxine possède deux domaines, un domaine N-terminal de 70 à 90 résidus, présent uniquement chez les eucaryotes qui contient la séquence d'adressage à la mitochondrie et un domaine C-terminal composé de 100 à 120 résidus conservés qui constitue la protéine mature (Huynen & al, 2001).

La production de la frataxine mature est réalisée par un processus très particulier en deux étapes. La frataxine est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 210 acides aminés importé dans la mitochondrie via une séquence d'adressage en N-terminal qui est ensuite clivée par la MPP (**M**itochondrial **P**rocessing **P**eptidase) au sein de la matrice mitochondriale entre la glycine 41 et la leucine 42 pour conduire à un intermédiaire de 19 kDa noté FXN⁴²⁻²¹⁰. Cette forme intermédiaire subit par la suite un second clivage par la MPP entre la lysine 80 et la sérine 81 pour donner naissance à une forme mature et fonctionnelle de 14 kDa notée FXN⁸¹⁻²¹⁰ (Koutnikova & al, 1998 ; Condò & al, 2007). D'autres états intermédiaires ont également été caractérisés comme l'intermédiaire FXN⁵²⁻²¹⁰ ou FXN⁷⁸⁻

Introduction bibliographique

²¹⁰ mais tendent à s'oligomériser en présence de fer, alors que la forme mature FXN⁸¹⁻²¹⁰ est uniquement retrouvée sous forme monomérique (O'Neill & al, 2005 ; Prischi & al, 2009). La présence des formes intermédiaires *in vivo* suggère qu'elles pourraient avoir un rôle, mais cela reste encore à déterminer.

Les alignements de séquences de la forme mature montrent des identités de séquence de l'ordre de 25 % et des similitudes comprises entre 40 et 70 %, ce qui suggère que la fonction de la frataxine a été conservée au cours de l'évolution. La structure de la frataxine de levure *S. cerevisiae* résolue par RMN (**Figure 23b**) et les structures cristallographiques des frataxines humaine et bactérienne d'*E. coli* (**Figure 23a,c**) montrent des structures très similaires caractérisées par un motif « sandwich $\alpha\beta$ » (Cho & al, 2000 ; He & al, 2004 ; Dhe-Paganon & al, 2000). Ce motif est constitué de 2 hélices α espacées par un assemblage entre 5 et 7 feuillets antiparallèles β et reliés par des boucles flexibles. Le domaine N-terminal se situe proche de la grande hélice α alors que le C-terminal se situe au niveau de la petite hélice α . En l'absence d'une fonction biochimique claire, des comparaisons de structures 3D avaient été réalisées. Le motif en « sandwich $\alpha\beta$ » est retrouvé dans différentes protéines notamment des métallo-chaperonnes à cuivre comme la protéine humaine HAH1, la protéine levure Atx1 et la protéine CopZ de *B. subtilis* (**Figure 23e,f,g**) (Anastassopoulou & al, 2004 ; Arnesano & al, 2001 ; Banci & al, 2003). Ce motif est également retrouvé dans la protéine NSP3 du coronavirus SARS au niveau de son domaine SUD-C (SARS-Unique Domain C-terminal) (**Figure 23h**) (Johnson & al, 2010) et dans une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire nommée Nqo15 qui a été proposée dans la régénération des centres Fe-S pour ce complexe (**Figure 23d**) (Sazanov & Hinchliffe, 2006). Cependant, ces comparaisons n'ont pas permis de déterminer la fonction de FXN dans l'assemblage des centres Fe-S.

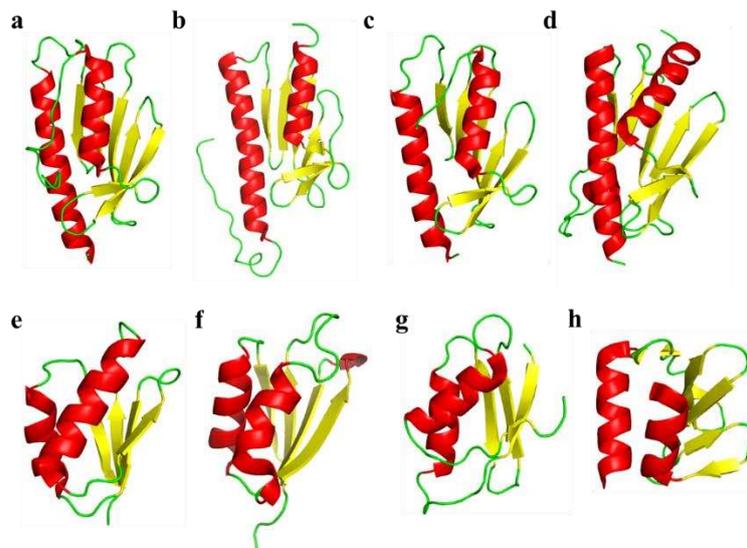


Figure 23 Structure de la frataxine et des protéines similaires structurellement de la frataxine. (a) Structure cristallographique de la frataxine de *H. sapiens* FXN (code PDB : 1ekg). (b) Structure résolue par RMN de la frataxine levure *S. cerevisiae* Yah1 (code PDB : 2ga5). (c) Structure cristallographique de la frataxine bactérienne *E. coli* CyaY (code PDB : 1ew4). (d) Structure

Introduction bibliographique

cristallographique de la sous-unité Nqo15 du complexe respiratoire I de *T. thermophilus* (code PDB : 3i9v). **(e-f-g)** Structures résolues par RMN des métallo-chaperonnes à cuivre HAH1 d'*H. sapiens* **(e)** (code PDB : 1TL5), Atx1 de *S. cerevisiae* **(f)** (code PDB : 1FES) et CopZ de *B. subtilis* **(g)** (code PDB : 1P8G). **(h)** Structure résolue par RMN du domaine SUD-C de la protéine NSP3 du coronavirus SARS (code PDB : 2KQW). Les différentes structures sont similaires et sont composées de 2 hélices α (en rouge) et de 5 à 7 feuillettes antiparallèles β (en jaune) reliés par des boucles flexibles (en vert).

Parmi les domaines les plus conservés de la frataxine, se trouve une région exposée au solvant constituée d'une dizaine de résidus acides, chargés négativement à pH physiologique (glutamates, aspartates) et de résidus hydrophiles portés par la première hélice α et le premier brin β (**Figure 24a, zone en rouge**) (Cho & al, 2000). Le second domaine conservé correspond à une zone spécifique du feuillet β (**Figure 24b, zone en rouge**). Les résidus orientés vers l'intérieur de la protéine ont un rôle de structuration et plusieurs d'entre eux sont conservés dont les résidus Ile145, Ile154, Tyr168 et Trp173. Les résidus exposés à la surface, essentiels à l'interaction avec les différents partenaires, sont aussi bien conservés dont les résidus Asn146, Gln148, Gln153 et Trp155.

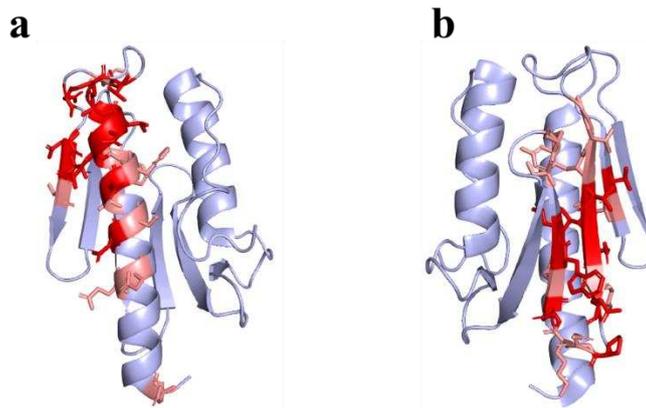


Figure 24 Représentation des résidus conservés de la frataxine. **(a-b)** Structure cristallographique de la frataxine de *H. sapiens* (code PDB : 1ekg) montrant les résidus conservés avec *E. coli*, *M. musculus* et *S. cerevisiae*. **(a)** Région des résidus acides et hydrophiles conservés au niveau de la première hélice α et 1 feuillet β , impliqués dans la liaison du fer. Les résidus de couleur saumon représentent ceux pour qui la liaison du fer a été établie. **(b)** Région des résidus conservés du feuillet β impliqué dans la structuration de la protéine et dans l'interaction avec ses partenaires. Les résidus de couleur saumon représentent les résidus partiellement conservés entre les espèces et les résidus de couleur rouge foncé représentent les résidus strictement conservés entre les espèces.

3.2.5 Les protéines de transfert

Une fois le centre Fe-S formé sur la protéine échafaudage, un système chaperon/co-chaperon va permettre le transfert du centre Fe-S vers des protéines de transport. Chez les procaryotes, ces deux protéines HscA (chaperonne) et HscB (co-chaperonne) sont encodées par l'opéron *isc*. Des homologues sont présents chez les eucaryotes, HSPA9 et HSC20 (Ssq1/Jac1 dans la levure) (Dutkiewicz & Nowak,

Introduction bibliographique

2018). La chaperonne HSPA9 possède deux domaines, un domaine ATPase localisé au niveau du N-terminal et un domaine SBD (Substrate Binding Domain) au niveau du C-terminal ayant la capacité de se lier spécifiquement sur la protéine échafaudage ISCU via un motif LPPVK hautement conservé dans toutes les ISCU (**Figure 25a**) (Silberg & al, 2001 ; Dutkiewicz & al, 2004 ; Cupp-Vickery & al, 2004). La co-chaperonne HSC20 possède aussi deux domaines, un domaine stimulant l'activité ATPase de HSPA9 et un domaine d'interaction avec ISCU (**Figure 25b**) (Hoff & al, 2000 ; Füzéry & al, 2008). Le C-terminal de la co-chaperonne HSC20 interagit avec des résidus hydrophobes et acides d'ISCU (**Figure 25b**) (Andrew & al, 2006 ; Füzéry & al, 2008 ; Ciesielski & al, 2012). Cette interaction permet le recrutement de la chaperonne HSPA9 qui se lie également au motif LPPVK d'ISCU (Dutkiewicz & al, 2004). L'hydrolyse d'ATP stimulé par la co-chaperonne HSC20 permet un changement conformationnel au niveau du domaine SBD de HSPA9 qui ensuite stimule le transfert du centre Fe-S d'IscU vers des protéines acceptrices.

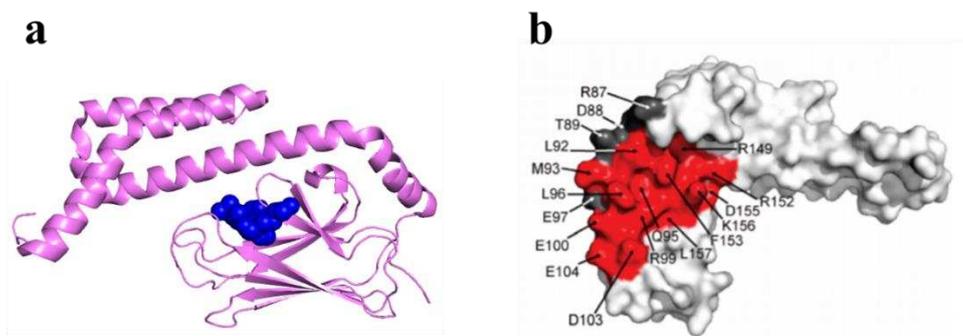


Figure 25 Zone d'interaction des chaperonnes HSPA9 et HSC20 avec ISCU. (a) Structure cristallographique de la chaperonne HscA d'*E. coli* en complexe avec le peptide LPPVK d'IscU (sphères bleues) (code PDB : 1u00). (b) Représentation de la surface de HscB d'*E. coli* avec les résidus impliqués dans l'interaction avec IscU (en rouge) déterminé par spectroscopie RMN. Cette interaction est médiée par une zone hydrophobe et acide. (Figure (b) issue de Füzéry & al, 2008)

3.2.6 Les protéines relais

La glutaredoxine 5 (GLRX5) mitochondriale a été caractérisée dans différents organismes eucaryotes (zebrafish, humain, levure, GrxS15 chez les plantes) comme l'une des principales protéines relais entre IscU et les protéines d'échafaudage IscA, ainsi que des protéines spécialisées (Bandyopadhyay & al, 2008 ; Couturier & al, 2015) (**Figure 26**). GLRX5 appartient à la famille des glutaredoxines monothiol qui sont extrêmement bien conservés entre organismes et forment un homodimère liant un centre [2Fe2S] inter-domaine pontant, coordonné par la cystéine conservée de GLRX5 et par le thiol d'une molécule de glutathion GSH (Rouhier & al, 2007 ; Picciocchi & al, 2007 ;

Introduction bibliographique

Banci & al, 2014). Quelques cas d'anémie sidérostique congénitale autosomale récessive liés à des mutations homozygotes du gène de la protéine GLRX5 ont été recensés (Camaschella & al, 2007 ; Liu & al, 2014 ; Daher & al, 2019). Chez le poisson zèbre et dans la levure, la délétion du gène *glrx5* n'est pas létale, il semble donc que soit la fonction de GLRX5 ne soit pas essentielle, soit que d'autres protéines soient capables de remplacer GLRX5, notamment GRX2 chez les eucaryotes supérieurs (Rodriguez Manzanque & al, 1999 ; Rodriguez-Manzanque & al, 2002 ; Wingert & al, 2005).

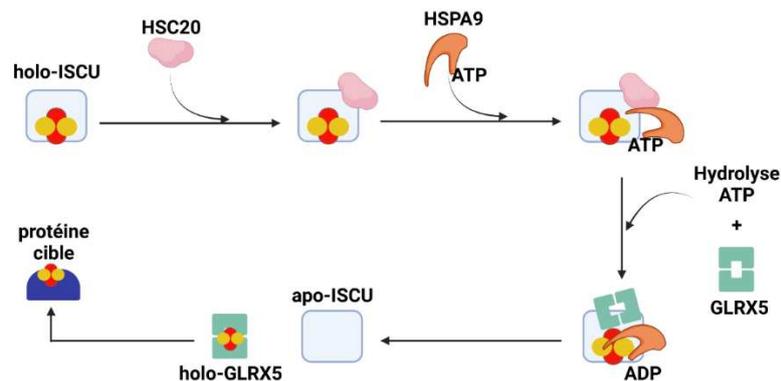


Figure 26 Modèle chaperonnes dépendant du transfert du centre Fe-S vers les protéines cibles. Le centre Fe-S nouvellement formé sur la protéine échafaudage ISCU est transféré vers la GLRX5 qui peut distribuer ce centre Fe-S aux protéines cibles. La co-chaperonne HSC20 se fixe sur ISCU permettant le recrutement de la chaperonne HSPA9 qui se lie spécifiquement sur le motif LPPVK de ISCU. L'hydrolyse d'ATP par HSPA9 permet un changement conformationnel favorable au transfert du centre Fe-S vers la GLRX5.

3.2.7 Protéines ISCA et protéines intervenant plus tardivement

La fonction des protéines IscA a longtemps été controversée. L'opéron *isc* code pour une seule protéine IscA qui a été dupliquée chez les eucaryotes sous forme ISCA1 et ISCA2. Les gènes *isca1* et *isca2*, simple et double mutant, sont non essentiels dans la levure ce qui suggère que les fonctions d'ISCA1 et ISCA2 sont redondantes avec d'autres protéines. La capacité d'IscA à lier fortement du fer avait initialement conduit à l'hypothèse d'une fonction de donneur de fer (Ding & al, 2004 ; Ding & al 2005 ; Wang & al, 2010). Mais la capacité d'IscA à lier des centres [2Fe2S] a permis d'émettre d'autres hypothèses concernant son rôle, principalement comme transporteur de centre Fe-S et comme protéine d'échafaudage en parallèle d'ISCU (Ollagnier-de-Choudens & al, 2001 ; Krebs & al, 2001 ; Morimoto & al, 2006 ; Mapolelo & al, 2013). Dans des cellules mammifères, souris et levures, l'absence des protéines ISCA1 et ISCA2 provoque un défaut d'assemblage spécifique des centres [4Fe4S] mais n'affecte pas la synthèse des centres [2Fe2S] (Mühlenhoff & al, 2011 ; Beilschmidt & al, 2017). Il semblerait donc que les protéines IscA soient spécialisées dans la biosynthèse des centres [4Fe4S].

Introduction bibliographique

IscA1 et IscA2 possèdent 3 résidus cystéines conservés et forment un hétérodimère capable de lier effectivement un centre [4Fe4S] *in vitro* (Brancaccio & al, 2014).

D'autres protéines s'associent à IscA, telles que Iba57 et Nfu, soit pour permettre l'assemblage des centres [4Fe4S], soit leur transfert et leur insertion. IBA57 forme un complexe avec ISCA2 partageant un centre [2Fe2S] coordonné par les 3 résidus cystéines de ISCA2 et par un résidu cystéine exposé au solvant de IBA57 (Gourdoupis & al, 2018 ; Nasta & al, 2019). NFU1 est une protéine homodimérique capable de transférer un centre [4Fe4S] *in vitro* vers l'aconitase mitochondriale (Cai & al, 2016). NFU1 montre une préférence pour transférer des centres [4Fe4S] vers les complexes I et II de la chaîne respiratoire ainsi que pour la lipoyl synthase (McCarthy & Booker, 2017 ; Uzarska & al, 2018). D'autres protéines telles que IND1 et BOLA3 sont impliquées respectivement dans la maturation du complexe I de la chaîne respiratoire et de la lipoyl synthase (Sheftel & al, 2009 ; Cameron & al, 2011 ; Couturier & al, 2014).

Les mutations dans les protéines impliquées dans la biosynthèse des centres [4Fe4S] (NFSU1, BOLA3, IBA57, ISAC2) conduisent à des syndromes multiples de dysfonctionnement mitochondriaux MMDS (**M**ultiple **M**itochondrial **D**ysfunction **S**ndrome) associés à une acidose métabolique, une hyperglycémie et une déficience dans les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la biosynthèse de l'acide lipoiq. La similitude des phénotypes associée aux défauts de NFSU1, BOLA3, IBA57 et ISAC2 renforce l'idée que les protéines ISCA participent aux étapes de biosynthèse et/ou transport des centres [4Fe4S], plutôt que comme chaperonne à fer pour ISCU (Ahting & al, 2015 ; Haack & al, 2013 ; Ajit-Bolar & al, 2013 ; Al-Hassnan & al, 2015).

3.3 Lien entre les machineries mitochondriale ISC et cytosolique CIA

La machinerie CIA assure la biosynthèse des centres Fe-S pour les protéines cytosoliques et nucléaires. Elle est composée de NBP35 (Nucleotide Binding Protein 35 kDa) et CFD1 (Cytosolic Fe-S cluster Deficient) qui forment la plateforme d'échafaudage des centres Fe-S et du couple CIAPIN/NDOR1 qui forment un système réductase apportant des électrons à NBP35-CFD1 mais dont la fonction n'a pas encore été établie (Stehling & al, 2008). NBP35 et CFD1 forment un complexe hétérotétramérique coordonnant deux types de centres [4Fe4S] après reconstitution *in vitro* (Netz & al, 2012). Un premier centre [4Fe4S] est partagé entre NBP35 et CFD1 et est coordonné au niveau de leurs C-terminal par des motifs CX₂C, un second centre [4Fe4S] est présent uniquement dans NBP35 et coordonné au niveau du N-terminal par un motif CX₁₈CX₂CX₂C absent chez CFD1. La glutarédoxine 3, GLRX3, est également impliquée dans le fonctionnement de la machinerie CIA ; son rôle serait le transport de centres Fe-S.

Introduction bibliographique

La synthèse des centres Fe-S des protéines cytosoliques et nucléaires étant dépendante de la présence des protéines de la machinerie ISC (NFS1, ISCU, FDX2, FXN, GLRX5) et du transporteur membranaire de type ABC, ABCB7 (Atm1 dans la levure), il a été proposé que la machinerie ISC synthétise un composé nécessaire à l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie CIA (Kispal & al, 1999 ; Cavadini & al, 2007). La nature de ce composé est inconnue, il est donc appelé composé X. Il pourrait s'agir soit d'un composé soufré, soit d'un centre Fe-S (Paul & Lill, 2015 ; Riedel & al, 2019). Ces hypothèses reposent sur des études menées dans la levure et dans des cellules humaines montrant que NFS1 n'est pas présente dans le cytoplasme et donc qu'il n'y a pas de source de soufre dans ce compartiment. L'hypothèse d'un composé soufré est soutenue par plusieurs éléments. La structure d'Atm1 et de son homologue bactérien montre la fixation de molécules de GSH au sein de sa cavité (Lee & al, 2012 ; Srinivasan & al, 2014). De plus, du glutathion oxydé (GSSG) et du glutathion trisulfure (GS-S-SG) sont capables de stimuler l'activité ATPase d'ATM3 d'*A. thaliana* (Schaedler & al, 2014). Enfin une étude menée dans la levure indique que la déplétion en GSH conduit à un défaut de synthèse des centres Fe-S (Kumar & al, 2011). Cependant, d'autres groupes seraient parvenus à détecter des formes cytosoliques de NFS1 et ISCU dans des cellules mammifères (Rouault, 2015). Mais ces protéines se trouvent en très faible quantité dans le cytoplasme et ces données ne sont pas cohérentes avec la dépendance mitochondriale de la machinerie ISC (Kispal & al, 1999 ; Cavadini & al, 2007 ; Marelja & al, 2008 ; Mühlhoff & al, 2004). De plus, dans la levure, Nbp35 et les homologues de CIAPIN et NDOR1, Dre2 et Tah18, sont des protéines essentielles, ce qui indique clairement que la machinerie CIA est la seule voie de synthèse des centres Fe-S dans le cytoplasme (Zhang & al, 2008 ; Vitale & al, 1996 ; Hausmann & al, 2005 ; Vernis & al, 2009). L'hypothèse de l'export d'un centre Fe-S a récemment trouvé un début de preuve expérimentale avec le travail de l'équipe de Dr. James Cowan montrant qu'Atm1 est capable d'exporter un centre $[2Fe2S]^{2+}$ complexé par 4 molécules de GSH ($[2Fe-2S](GS)_4$) (Li & Cowan, 2015).

De manière remarquable, toutes les cibles la machinerie CIA identifiées à ce jour, sont des protéines $[4Fe4S]$ et cette machinerie n'est pas impliquée dans la biosynthèse des centres $[2Fe2S]$ des protéines cytoplasmiques mitoNEET, CIAPIN et GLRX3. Il semblerait donc qu'il existe une autre machinerie cytoplasmique en amont de la CIA (appelée machinerie X) assurant la biosynthèse de centres $[2Fe2S]$ via le composé X, où simplement le transport de centres $[2Fe2S]$ s'il s'avère que le composé X est un centre $[2Fe2S]$ (**Figure 15**). Dans le cas où le composé X serait un composé soufré la machinerie X serait donc capable de synthèse *de novo* de centre Fe-S et la machinerie CIA serait exclusivement impliquée dans la synthèse des centres $[4Fe4S]$. Nbp35 et les homologues de CIAPIN et NDOR1, Dre2 et Tah18, étant des protéines essentielles dans la levure, la machinerie CIA serait donc la seule voie assurant l'assemblage des centres $[4Fe4S]$ dans ce compartiment.

Dans l'hypothèse, où le composé X serait un composé soufré, le système réductase CIAPIN/NDOR1 pourrait être impliqué dans une étape de réduction en ions sulfure pour l'assemblage

Introduction bibliographique

par la machinerie X. Cependant, la délétion de CIAPIN1 n'affecte pas la maturation du centre [2Fe2S] de mitoNEET, mais engendre une diminution drastique des centres [4Fe4S] cytosoliques (Ferecatu & al, 2014). Il semblerait donc que son rôle se limite à la biosynthèse des centres [4Fe4S] par la machinerie CIA.

Dans les étapes plus tardives, les centres Fe-S sont pris en charge par la protéine IOP1 (Nar1 dans la levure) avec les protéines de transfert CIA1 (Cia1 chez la levure), CIA2A (Cia2A chez la levure), CIA2B (Cia2B chez la levure) et MMS19 (Met18 chez la levure). IOP1 est une protéine capable de lier deux centres [4Fe4S] permettant le transfert de ces centres via le complexe tertiaire CIA1-CIA2B-MMS19 qui permet l'insertion des centres Fe-S (Seki & al, 2012 ; Stehling & al, 2012 ; Srinivasan & al, 2007 ; Stehling & al, 2013).

3.4 Mécanisme de biosynthèse par la machinerie ISC

Le mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S sur la plateforme d'assemblage IscU était l'une des questions majeures lorsque j'ai commencé ma thèse. Notamment comment le fer est apporté à IscU et sous quelle forme, comment le persulfure généré par NFS1/IscS est converti en ions sulfures, quel type de centres Fe-S est synthétisé par IscU/ISCU : [2Fe2S] et/ou [4Fe4S] et par quels mécanismes, comment les insertions du fer et du soufre sont-elles coordonnées pour permettre l'assemblage ordonné des ions sulfure et fer en centres Fe-S, quels rôles jouent Fdx/FDX2 et CyaY/FXN dans ce processus et dans quel ordre interviennent-elles ?

3.4.1 La source de fer

Alors que des formes d'ISCU liant soit un atome de zinc soit un centre [2Fe2S] ont été structurellement caractérisées (Agar & al, 2000 ; Ramelot & al, 2004), aucune forme liant un atome de fer n'avait été clairement caractérisée au début de ma thèse. Des expériences d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) réalisées par l'équipe du Dr. James Cowan dans les années 2000 avaient mis en évidence qu'ISCU pouvait lier deux atomes de fer ferreux mais aussi ferrique (Nuth & al, 2002). La source de fer serait potentiellement le LIP mitochondrial. Cette hypothèse s'appuie sur des données suggérant que selon la nature des métaux et leur affinité pour les sites protéiques, leur concentration est maintenue à des niveaux différents. Les métaux à forte affinité pour les sites métalliques protéiques dont Zn^{2+} , Ni^{2+} et Cu^{2+} sont maintenus à des concentrations très faibles alors que les métaux à faible affinité comme le Fe^{2+} sont présents dans des LIP à plus forte concentration de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} M ce qui est supérieur aux constantes d'affinité pour les protéines à fer qui sont de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} suggérant un transport passif (Foster & al, 2014 ; Dudev & Lim, 2013 ; Ba & al, 2009). Des petites molécules organiques telles

Introduction bibliographique

que le sidérophore 2,5-DHBA (Mühlenhoff & al, 2010 ; Devireddy & al, 2010) ou bien le phosphate, le citrate, la cystéine ou le GSH mais avec une spécificité plus faible, pourraient également faciliter l'insertion du fer en le rendant biodisponible.

Cependant, la présence d'un atome de zinc dans IscU pose question étant donné que ce métal a une affinité beaucoup plus forte que le fer pour les sites métalliques des protéines. De plus, des études par spectroscopie RMN ont remis en cause la fixation directe du fer sur ISCU (Adinolfi & al, 2004). En effet, en présence de 5 équivalents molaires de Fe^{2+} , aucune perturbation du déplacement chimique d'ISCU (normalement induite par la fixation d'une molécule diamagnétique) n'est observée sur les spectres RMN suggérant qu'ISCU est incapable d'interagir avec du fer ferreux ou ferrique (Adinolfi & al, 2004). Ces résultats ont conduit à l'hypothèse qu'une protéine chaperonne serait nécessaire pour apporter le fer à ISCU lors de l'assemblage des centres Fe-S.

En raison de sa capacité à lier du fer ferreux et ferrique *in vitro*, la frataxine a très vite été proposée comme la chaperonne à fer pour la machinerie d'assemblage. Mais, suite aux découvertes récentes suggérant un rôle dans l'insertion du soufre, cette hypothèse a été remise en cause.

La ferrochélatase, la métallo-chaperonne mitochondriale qui permet l'insertion du fer dans la porphyrine IX pour produire les hèmes a également été proposée pour l'insertion du fer dans ISCU mais cela n'a jamais été démontré (Al-Karadaghi & al, 2006). Les protéines IscA ont également été proposées comme chaperonnes à fer mais comme nous l'avons vu précédemment ces protéines sont impliquées dans la biosynthèse des centres [4Fe4S] (Ding & al, 2004 ; Ding & al, 2005 ; Wang & al, 2010).

Au final, le processus d'insertion du fer dans IscU/ISCU était totalement énigmatique. De plus, si le zinc est présent en conditions physiologiques comment est-il échangé avec le fer ? Existe-t-il une métallo-chaperonne pour effectuer cet échange ?

3.4.2 Insertion du soufre

Le processus d'insertion du soufre est probablement celui qui avait été le mieux étudié. Les premières études avec les protéines de *A. vinelandii* et *E. coli* ont montrées qu'IscS est capable de fournir du soufre à IscU sous forme persulfure par réaction de transpersulfuration via des résidus cystéines (**réaction 11**) (Smith & al, 2001 ; Urbina & al, 2001 ; Smith & al, 2005).



Étonnamment, jusqu'à 6 persulfures ont été retrouvés dans IscU par spectrométrie de masse. Ces persulfures semblent être transférés sur plusieurs résidus cystéines d'IscU incluant Cys37, Cys63 et Cys106 et également sous forme de polysulfures (Smith & al, 2005). Étant donné que la protéine IscU

Introduction bibliographique

utilisée ne contenait pas de fer (bien que cela n'ait pas été recherché), ces résultats ont conduit à un premier modèle dans lequel le transfert de persulfure précède l'insertion du fer dans IscU.

Cependant, une étude d'IscU de *T. maritima* a mis évidence la fixation de deux atomes de fer à IscU sans que la protéine n'ait besoin d'être préalablement persulfurée et une perte d'affinité pour le fer une fois persulfurée (Nuth & al, 2002). De plus, les auteurs ont rapporté que la forme persulfurée ne pouvait pas être réduite par le fer mais que l'ajout de fer avant IscS et la cystéine conduisait à la formation de centres Fe-S. Les auteurs ont donc proposé un modèle alternatif dans lequel l'insertion du fer précède le transfert de persulfure et où le fer est le réducteur du persulfure en ions sulfures.

Une autre hypothèse avait été émise dans laquelle un atome de fer pourrait se lier directement sur le persulfure de la cystéine désulfurase formant une espèce Cys-S-S-Fe²⁺ qui serait directement transférée à la protéine ISCU (Layer & al, 2006).

Le transfert de persulfure a également été étudié avec les protéines eucaryotes de *M. musculus* et *H. sapiens*. Notre laboratoire a montré en 2015 que le complexe NFS1-ISD11-ACP transfère un seul persulfure à ISCU sur sa cystéine Cys104 et en absence de fer (Parent & al, 2015). Il faut noter que la présence du zinc et son effet n'avaient pas été évalués dans ces études.

Plusieurs structures de complexes entre IscU/ISCU et IscS/NFS1 ont été résolues qui permettent de mieux comprendre le processus d'insertion de soufre. Les structures cristallographiques des complexes entre IscS et IscU d'*E. coli* et NFS1-ISD11-ACP et ISCU humains montrent des structures très similaires où les protéines IscS/NFS1 forment des dimères en conformation « fermée » liant chacune deux IscU/ISCU sous forme d'un monomère par sous-unité (**Figure 27**) (Shi & al, 2010 ; Boniecki & al, 2017). La structuration en dimère semble donc être un élément clé du processus d'insertion de soufre. L'inspection du site d'assemblage d'ISCU dans le complexe (NFS1-ISD11-ACP-ISCU)₂ où du zinc est présent dans le site d'assemblage montre que la fixation de NFS1 engendre une réorganisation des ligands du site métallique d'ISCU. La cystéine catalytique de NFS1, Cys381, portée par la boucle flexible se fixe au métal par échange avec la cystéine Cys35 d'ISCU. Cette configuration pourrait faciliter l'insertion de persulfure dans le site d'assemblage d'ISCU, mais aucune structure avec du fer n'a été résolue pour montrer que ce changement se produit également dans les conditions d'assemblage Fe-S.

Introduction bibliographique

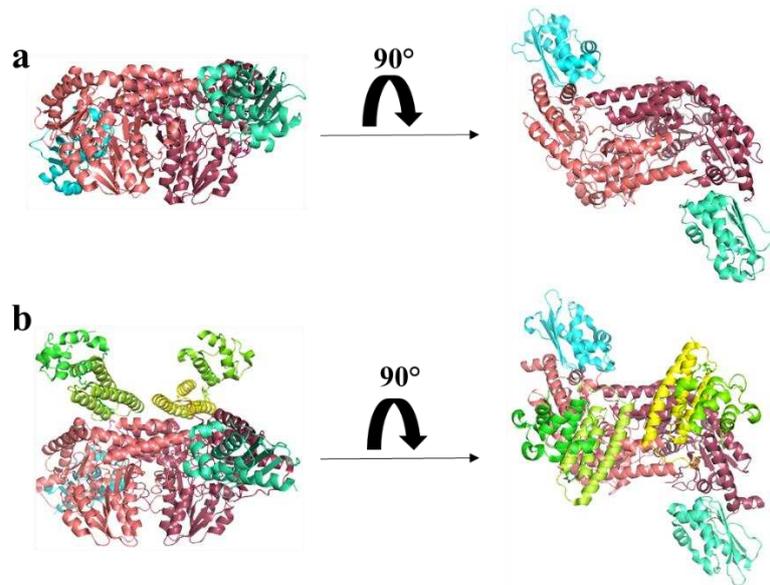
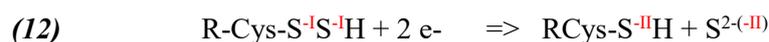


Figure 27 Structure du complexe de la machinerie ISC. **(a)** Structure cristallographique du complexe IscS-IscU d'*E. coli* (code PDB : 3LVL). Un monomère d'IscU se lie sur chaque monomère d'IscS. **(b)** Structure cristallographique du complexe NFS1-ISD11-ACP-ZnISCU de *H. sapiens* (code PDB : 5w1w). L'architecture du complexe est similaire au complexe de IscS-IscU. NFS1 et IscS sont en rose clair et foncé, ISD11 en jaune clair et foncé, ACP en vert clair et foncé, ISCU en cyan et vert turquoise.

L'ensemble de ces données suggère donc que le soufre est fourni à IscU/ISCU sous forme de persulfure dans le site d'assemblage. Cependant, la séquence, fer ou soufre en premier, restait à déterminer ainsi que le nombre de persulfures en présence de fer dans IscU/ISCU et le mécanisme permettant de coordonner les apports en fer et en soufre.

3.4.3 Processus de réduction des persulfures en ions sulfure

Afin de former un centre Fe-S le persulfure doit être réduit pour générer un ion sulfure S^{2-} (**réaction 12**). Au cours de cette réaction les deux atomes de soufre du persulfure sont initialement au degré d'oxydation $-I$ et sont réduits à l'état $-II$ pour donner un ion sulfure et un thiol. Deux électrons sont donc nécessaires pour réduire un persulfure.



Plusieurs réducteurs potentiels ont été proposés pour cette réaction:

- Les thiols

Les reconstitutions de centres Fe-S *in vitro* réalisées avec des réducteurs tels que le DTT, GSH ou encore la L-cystéine, ont montré la capacité des thiols à réduire les persulfures pour produire des ions

Introduction bibliographique

sulfure selon la réaction 13. Cependant, les études menées au laboratoire ont montré que les thiols réduisent le persulfure de NFS1, celui transféré à ISCU étant particulièrement difficile à réduire par ce type de molécules. De plus cette réaction est indépendante du fer. Il est donc difficile d'imaginer comment des centres Fe-S peuvent être formés par ce processus.



- Le fer

Dans le modèle où l'insertion de persulfure précède l'atome de fer, il a été proposé que l'atome de Fe^{2+} joue le rôle de réducteur (Smith & al, 2001 ; Urbina & al, 2001). Cependant, cette réduction ne libère qu'un seul électron par l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} alors que la réduction d'un persulfure en nécessite deux. Ce processus nécessiterait donc l'intervention de plusieurs atomes fer dont certains sacrificiels qui serait libéré sous forme d'ions Fe^{3+} particulièrement insoluble. Ce processus semble donc peu probable.

- La ferrédoxine

Des reconstitutions des systèmes levure et bactérien ont montré la capacité du couple Fdx/FdxR avec du NADPH à remplacer le DTT pour la production de centres Fe-S (Webert & al, 2014 ; Yan & al, 2015). De plus, les résultats SAXS obtenus par l'équipe de Miroslaw Cygler ont montré que le centre [2Fe2S] de FDX2 est très proche du site d'assemblage d'ISCU ce qui semble compatible avec un rôle de donneur d'électrons (Boniecki & al, 2017). Cependant, les vitesses des réactions d'assemblage réalisées avec Fdx sont plus lentes que celles réalisées avec le DTT, suggérant que Fdx serait moins efficace que les thiols. De plus, le rôle exact de Fdx dans ces reconstitutions n'a pas été démontré. Fdx réduit-elle le persulfure d'IscU ou IscS ? Ou aurait-elle un autre rôle ? Il avait notamment été montré que Fdx fournit les électrons pour le couplage réducteur de centres [2Fe2S] en centre [4Fe4S] dans IscU. Il n'était donc pas établi lorsque j'ai commencé ma thèse, si Fdx était capable de réduire un persulfure.

3.4.4 Rôle de la frataxine dans la biosynthèse de centres Fe-S

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le rôle de la frataxine dans la biosynthèse des centres Fe-S. Sur la base des phénotypes cellulaires : accumulation de fer dans la mitochondrie et défaut de biosynthèse des centres Fe-S et des hèmes, l'hypothèse d'un rôle dans le stockage du fer a rapidement émergé.

Introduction bibliographique

- Rôle de protéine de stockage du fer

Les premières études menées *in vitro* ont montré que des frataxines issues de différents organismes, aussi bien eucaryotes que procaryotes, étaient capables de lier du fer. Des affinités de l'ordre de 10^{-6} pour le Fe^{2+} ont été mesurées par ITC pour les frataxines bactérienne et levure, CyaY et Yfh1 (Bou-Abdallah & al, 2004 ; Cook & al, 2006). Les analyses par ITC ont de plus montré que ces frataxines étaient capables de lier jusqu'à 7 atomes de Fe^{2+} ou Fe^{3+} (Yoon & Cowan, 2003 ; Yoon & Cowan, 2004 ; Huang & al, 2008). Il a ensuite été observé que CyaY et Yfh1 étaient capables de stocker du fer ferrique (jusqu'à 3000 atomes de fer) par auto-assemblage en oligomère de taille > 1 MDa (Adamec & al, 2000 ; Gakh & al, 2002). Un processus d'auto-assemblage et de stockage du fer similaire aux ferritines a été proposé. Dans le système humain, une structure à basse résolution utilisant la coloration négative par microscopie électronique a montré la formation d'un oligomère regroupant 24 complexes NIUF (**Figure 28c**) (Gakh & al, 2016). Ce complexe est constitué d'un sous-complexe composé des 24 unités d'ISCU et de FXN, avec un trimère symétrique d'ISCU liant un trimère symétrique de FXN à chacun de ces huit sommets. La fixation de douze dimères de NFS1-ISD11 à la surface permet la formation d'une macromolécule globulaire avec un diamètre d'environ 15 nm avec 24 sites de formation de centres Fe-S.

Cependant cette fonction de stockage du fer a été remise en question car une surexpression de Yfh1 dans des souches Δggcl accumulant du fer ne permet pas de diminuer l'excès de fer présent dans les mitochondries (Seguin & al, 2010). De plus, il a été montré que des mutants de Yfh1 incapables d'oligomériser, ne présentent aucun phénotype même lorsque la protéine est faiblement exprimée ou lorsque le niveau en fer mitochondrial est élevé (Aloria & al, 2004, Schmucker & al, 2008). Dans les études de la structure du super-complexe NIUF, les auteurs avaient utilisé une forme non mature de la frataxine FXN^{42-210} humaine qui tend à oligomériser, posant ainsi la pertinence physiologique de cette structure. De plus, aucun oligomère n'a été observé *in vitro* avec la forme complètement mature de FXN^{81-210} humaine qui est la forme prédominante *in vivo* (Prischi & al, 2009 ; Gakh & al, 2010). Enfin, une étude réalisée avec un modèle souris reproduisant les phénotypes de l'ataxie de Friedreich, a montré que le défaut de biosynthèse des centres Fe-S précède l'accumulation de fer, ce qui suggère que l'accumulation de fer est une conséquence et non pas la cause du défaut de biosynthèse des centres Fe-S (Martelli & Puccio, 2014).

- Rôle comme chaperonne à fer

Bien que la fonction de stockage par oligomérisation soit clairement remise en cause, la frataxine reste capable de lier du fer *in vitro* sous sa forme monomérique (Layer & al, 2006 ; Yoon & Cowan, 2003). Plusieurs acides aminés conservés ont été identifiés pour la liaison du fer notamment des

Introduction bibliographique

glutamates et des aspartates dans son domaine acide (Layer & al, 2006 ; Yoon & Cowan, 2003). Il a donc été proposé que la frataxine vienne apporter le fer à la machinerie de biosynthèse des centres Fe-S et de l'hème. En effet, il a été montré assez tôt que les frataxines de levure et humaine étaient capables d'interagir avec le complexe NFS1-ISCU (Gerber & al, 2003 ; Ramazzotti & al, 2004). Ces données ont ensuite été confirmées par de nombreuses études biophysiques et structurales avec les complexes eucaryotes et procaryotes, montrant une interaction directe entre le complexe IscS-IscU et CyaY et entre les complexes eucaryotes NIAU et FXN (Adinolfi & al, 2009 ; Prischi & al, 2010 ; Fox & al, 2019, Colin & al, 2013) (**Figure 28a,b**).

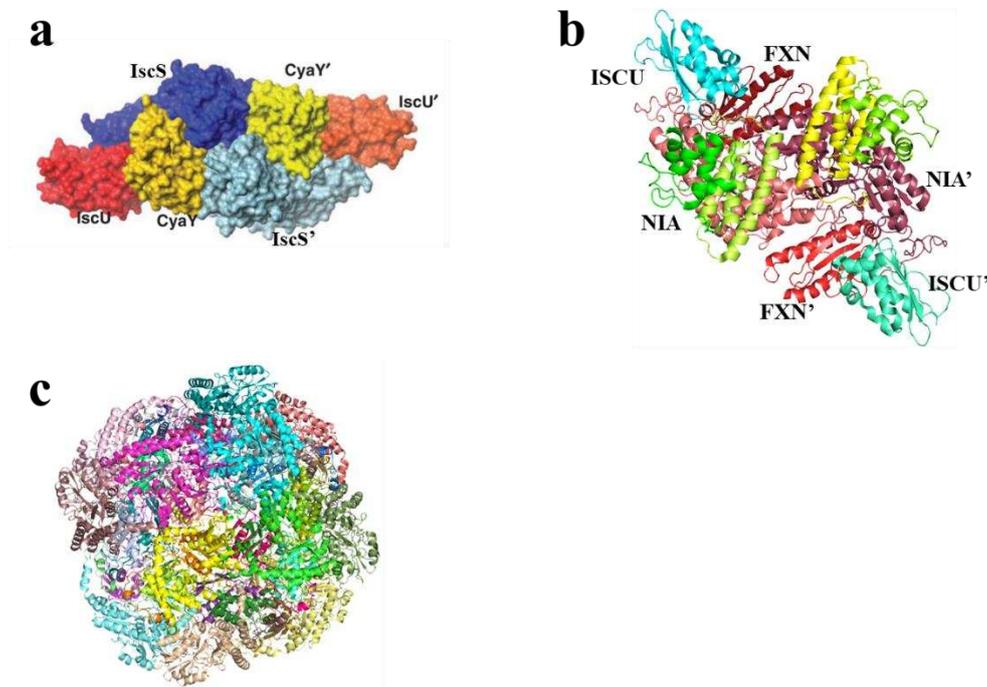


Figure 28 Modèle et structure des complexes de la machinerie ISC en présence de la frataxine. **(a)** Modèle obtenu pour le complexe IscS-IscU-CyaY par des expériences de SAXS et de RMN (*issue de Prischi & al, 2010*). **(b)** Structure du complexe humain NIAUF résolue par microscopie électronique (code PDB : 6nzu). **(c)** Structure oligomérique du complexe humain NFS1-ISD11-ISCU-FXN avec une forme non mature de la FXN obtenue par coloration négative (code PDB : 5kz5).

Une interaction entre FXN et la ferrochélatase, l'enzyme qui assure l'insertion du fer dans la porphyrine à la dernière étape de biosynthèse de l'hème, a également été détectée *in vivo* et confirmée *in vitro* avec un K_d de l'ordre de 40×10^{-9} (Lesuisse & al, 2003 ; Yoon & Cowan, 2004). Cependant, d'autres études *in vivo* dans des lymphoblastes n'ont pas permis de confirmer cette interaction (Schmucker & al, 2011). De plus, il a été montré que la déplétion de Yfh1p dans la levure *S. cerevisiae*, ne diminuait pas la quantité d'hème *in vivo* suggérant ainsi que la frataxine n'agit pas sur la biosynthèse des hèmes (Mühlenhoff & al, 2002). D'autres études ont enfin montré que la déficience en hème était

Introduction bibliographique

induite par un effet à long terme de la non-disponibilité du fer qui malgré son accumulation dans les mitochondries reste sous une forme de nanoparticules amorphes de phosphate ferrique insolubles, et non pas par un effet direct de la frataxine (Lesuisse & al, 2003 ; Schoenfeld & al, 2005). Par contre, des interactions fortes ont été clairement mises en évidence entre FXN, Yfh1 et CyaY et les protéines NFS1/IscS et ISCU/IscU, dans différents organismes. De plus, les études dans les modèles souris et levure, ont montré que le défaut de biosynthèse des centres Fe-S est très précoce (Martelli & Puccio, 2014) (Mühlenhoff & al, 2002). Sur la base de ces données, il est largement accepté, aujourd'hui, que la frataxine intervient uniquement dans la biosynthèse des centres Fe-S et pas dans celle de l'hème. La présence d'un centre Fe-S au sein de la ferrochélatase des mammifères (non présent dans la levure) pourrait directement lier la déficience en hème à la déficience en centres Fe-S au moins chez les mammifères.

Bien que des interactions fortes ont été mises en évidence entre FXN, Yfh1 et CyaY et les composants de la machinerie ISC, il n'avait pas été clairement établi que la frataxine était capable d'assurer l'insertion du fer dans IscU car aucune forme d'IscU liant le fer à l'étape initiale de synthèse des centres Fe-S n'avait été caractérisée. De plus, aucun site métallique défini n'est visible dans les différentes structures de frataxines. La frataxine possède une large interface acide lui permettant de lier plusieurs atomes de fer, aussi bien ferreux que ferrique (Huang & al, 2008). Il semble donc que la frataxine lie du fer de manière non spécifique, plutôt que spécifique.

- Rôle de la frataxine dans la production d'ions sulfure fer-dépendante

Alors que les données chez les eucaryotes (modèles levure, patient FA) montraient un déficit en centres Fe-S suggérant un rôle d'activateur, l'équipe du Dr. Annalisa Pastore a montré qu'*in vitro*, CyaY jouait le rôle de régulateur négatif sur la formation des centres Fe-S (Adinolfi & al, 2009). En effet, les reconstitutions de la machinerie ISC utilisant du DTT à la place de Fdx, montrent une inhibition en présence de CyaY, corrélée à une diminution de la vitesse de formation de L-alanine, produit de la désulfuration de la L-cystéine par IscS. De plus, cet effet inhibiteur est accru en présence de fer. Les auteurs en ont conclu à un rôle préventif de CyaY sur la formation d'ions sulfures par IscS en condition d'excès de fer qui permettrait d'éviter une « surproduction » de centres Fe-S pouvant conduire à une accumulation de fer et à un stress oxydant (fonction « gate-keeper »). L'effet de CyaY comme protecteur contre la surproduction d'ions sulfures en conditions riches en fer pourrait alors expliquer l'effet fer-dépendant de CyaY sur la biosynthèse de centres Fe-S observé *in vivo* (Roche & al, 2015).

Cependant, un effet opposé a ensuite été observé avec des systèmes eucaryotes reconstitués (souris et humain). Dans ces reconstitutions, qui utilisaient également le DTT comme réducteur, un effet stimulateur de la frataxine FXN sur l'activité CD de NFS1 en complexe avec ISCU a été rapportée (Parent & al, 2015 ; Colin & al, 2012 ; Tsai & al, 2011). Cette stimulation conduit à une augmentation

Introduction bibliographique

de la production d'ions sulfures. Afin de mieux comprendre à quelle étape la frataxine agit dans le cycle catalytique de l'enzyme, des études enzymatiques ont été conduites au laboratoire. L'activité CD en présence de DTT ou d'un autre thiol (cystéine, GSH) comme réducteur, se décompose en deux étapes principales: **(1)** formation du persulfure à partir de L-cystéine ; **(2)** réduction du persulfure par le réducteur à thiol (RSH) conduisant à la formation de thiol persulfuré (RSSH) ; **(3)** réduction de RSSH par une autre molécule de RSH menant à la formation de H₂S et de thiol oxydé (RSSR) (**Figure 29**).

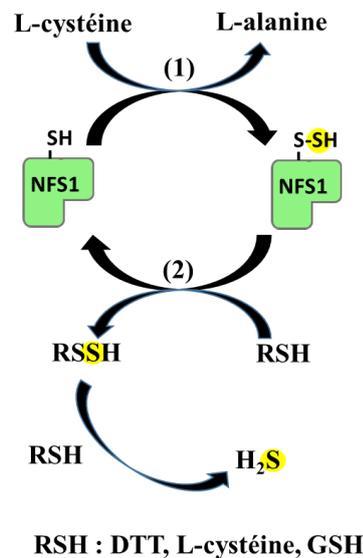


Figure 29 Schéma explicatif de l'activité CD de NFS1. Cette activité CD se décompose en deux étapes : **(1)** formation du persulfure par désulfuration de la L-cystéine ; **(2)** réduction du persulfure de NFS1 par un réducteur RSH (= DTT, L-cystéine, GSH) ; **(3)** réduction du persulfure du réducteur par une autre molécule RSH menant à la formation de H₂S. (*Inspiré de Srouf & al, 2020*)

L'activité CD est mesurée en quantifiant la L-alanine ou le H₂S formé après plusieurs cycles catalytiques de l'enzyme. Dans ce type de réaction multi-étape, la vitesse globale de la réaction est limitée par la réaction la plus lente d'entre elles (appelée étape cinétiquement limitante ou déterminante). La vitesse globale est alors égale à la vitesse de cette réaction. Donc, si la frataxine joue un rôle sur l'activité CD, c'est nécessairement qu'elle agit sur l'étape cinétiquement limitante de ce processus. Les premières études avaient proposé que la frataxine stimule la formation du persulfure de NFS1, mais la démonstration que cette étape était limitante n'avait pas été apportée (Bridwell-Rabb & al, 2014 ; Tsai & Barondeau, 2010 ; Colin & al, 2013 ; Tsai & al, 2011). Des expériences menées au laboratoire ont ensuite montré que la vitesse de production d'alanine est dépendante de la concentration en DTT. Or, dans le cycle catalytique menant à la production d'alanine, le DTT n'intervient qu'à l'étape de réduction ce qui suggèrerait que la réduction était l'étape limitante (Parent & al, 2015). Des études menées en mesurant indépendamment les cinétiques de formation et de réduction de persulfure ont confirmé que la réduction (**étape 2**) était beaucoup plus lente que la formation de persulfure (**étape 1**) (Parent & al,

Introduction bibliographique

2015). En conclusion, ces résultats indiquent que la frataxine accélère l'étape de réduction du persulfure de NFS1 par le DTT et non pas sa formation. Cependant, la question de la pertinence physiologique de cette réaction s'est posée, car d'une part le DTT n'est pas un réducteur physiologique et d'autre part, même si la cystéine et le GSH peuvent agir comme réducteur physiologique la production d'ions sulfure libres peut-elle être contrôlée pour former des centres Fe-S ? De plus, ces ions sulfures peuvent aisément diffuser *in vivo* et donc la probabilité de rencontrer un atome de fer à l'extérieur du complexe est très faible, limitant ainsi la formation de centres Fe-S.

- Rôle de la frataxine dans la stimulation du transfert de persulfure

Des études menées au laboratoire et par l'équipe de David Barondeau ont montré que les frataxines humaines et de souris favorisent le transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU (Bridwell-Rabb & al, 2014 ; Parent & al, 2015). Les études cinétiques réalisées au laboratoire ont montré que le transfert de persulfure vers ISCU était accéléré par un facteur 25 en présence de frataxine. Cependant, les tentatives de réduire le persulfure transféré à ISCU par du DTT ou par FDX2 se sont avérées infructueuses, ce qui n'a pas permis d'établir si l'effet accélérateur de la frataxine était lié à la biosynthèse des centres Fe-S.

3.4.5 Nature du centre Fe-S formé par ISCU, [2Fe2S] ou [4Fe4S] ?

Les premières reconstitutions de centres Fe-S utilisant IscS, de la L-cystéine en excès comme source de soufre et du DTT comme réducteur ont montré qu'IscU d'*A. vinelandii* était capable d'assembler séquentiellement un centre [2Fe2S] puis un centre [4Fe4S] (Yoon & Cowan, 2003 ; Agar & al, 2000). Ces études avaient montré la formation en premier lieu d'une espèce dimérique contenant un centre [2Fe2S] puis deux, pour enfin conduire à la formation d'un centre [4Fe4S] (Agar & al, 2000). La formation d'un mélange de centres [2Fe2S] et [4Fe4S] a également été observée dans des conditions de reconstitutions similaires avec ISCU de *H. sapiens* en présence du complexe NFS1-ISD11-ACP et de DTT (Tsai & al, 2010 ; Colin & al, 2013). Il semble donc, d'après ces reconstitutions, qu'ISCU soit capable d'assembler des centres [4Fe4S]. Cependant, la cinétique du processus de formation des centres [2Fe2S] et [4Fe4S] est particulièrement lente, plus de 10 heures pour former un centre [4Fe4S]. Il avait été montré que le couplage réducteur de centres [2Fe2S] en [4Fe4S] pouvait être catalysé, donc accéléré, par Fdx mais la formation des centres [2Fe2S] elle-même restait une étape lente. De plus, la famille des protéines d'échafaudage de type A, IscA, a été proposée pour l'assemblage des centres [4Fe4S]. Dans des cellules mammifères et souris et dans la levure, l'absence des protéines ISCA1 et ISCA2 provoque un défaut spécifique d'assemblage des centres [4Fe4S] mais n'affecte pas la synthèse des centres [2Fe2S] (Mühlenhoff & al, 2011 ; Beilschmidt & al, 2017).

Toutes ces reconstitutions ayant été réalisées avec du DTT comme réducteur, la question de la pertinence physiologique s'est posée. Plus récemment, deux études ont été réalisées avec Fdx à la place

Introduction bibliographique

du DTT, mais il n'a pas été clairement montré que seuls des centres [2Fe2S] sont formés dans ces conditions. De nombreuses questions restaient donc en suspens lorsque j'ai débuté ma thèse.

4. Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse a été de déterminer le mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par les deux machineries ISC, eucaryote et bactérienne, afin de répondre à plusieurs questions : quelle est la nature de la forme d'IscU/ISCU liant le fer, comment le fer est inséré dans IscU/ISCU et dans quel site, comment le soufre est inséré et dans quel ordre, fer ou soufre d'abord, comment ces insertions de soufre et de fer sont-elles coordonnées pour former un centre polynucléaire Fe-S, quel sont les rôles spécifiques de la ferrédoxine et de la frataxine, quelle est la nature des centres Fe-S formés par IscU/ISCU, [2Fe2S] ou [4Fe4S] ?

Pour cela, nous avons reconstitué *in vitro* les machineries ISC de souris (*M. musculus*) et d'*E. coli* avec l'ensemble des partenaires, c'est-à-dire en incluant FDX2/Fdx et sa réductase FDXR/FdxR à la place du DTT. Nous avons donc purifié les protéines ISCU/IscU, NFS1-ISD11-ACP/IscS, FDX2/Fdx, FDXR/FdxR et FXN/CyaY pour réaliser des reconstitutions des machineries ISC et étudier le processus d'assemblage des centres Fe-S. Nous avons utilisé une très large gamme d'approches biochimiques, cinétiques, spectroscopiques et structurales afin d'étudier le mécanisme étape par étape et caractériser les différents états intermédiaires du processus d'assemblage des centres Fe-S. Nous avons enfin cherché à comprendre les particularités des machineries eucaryotes et procaryotes pouvant expliquer leur dépendance plus ou moins importante vis-à-vis de la frataxine.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

1. Matériels biologiques

1.1 Plasmides utilisés pour la surexpression des protéines recombinantes

Plusieurs plasmides ont été utilisés afin de réaliser la surexpression des protéines recombinantes provenant de *M. musculus*. Le plasmide pETDuet a permis de surexprimer ISCU³⁶⁻¹⁶⁸ et ces mutants (fourni par le Dr Hélène PUCCIO, IGBMC, Strasbourg), le plasmide pCDFDuet a permis de surexprimer le complexe NFS1⁵⁹⁻⁴⁵⁹-ISD11 (fourni par le Dr Hélène PUCCIO, IGBMC, Strasbourg), le plasmide pET-16 a permis de surexprimer la FXN⁷⁹⁻²⁰⁷ (fourni par le Dr Hélène PUCCIO, IGBMC, Strasbourg) et le plasmide pET-28b de surexprimer la FDX2⁵³⁻¹⁸³ (commandé chez GenScript, Piscataway, USA) (**Figure 30**).

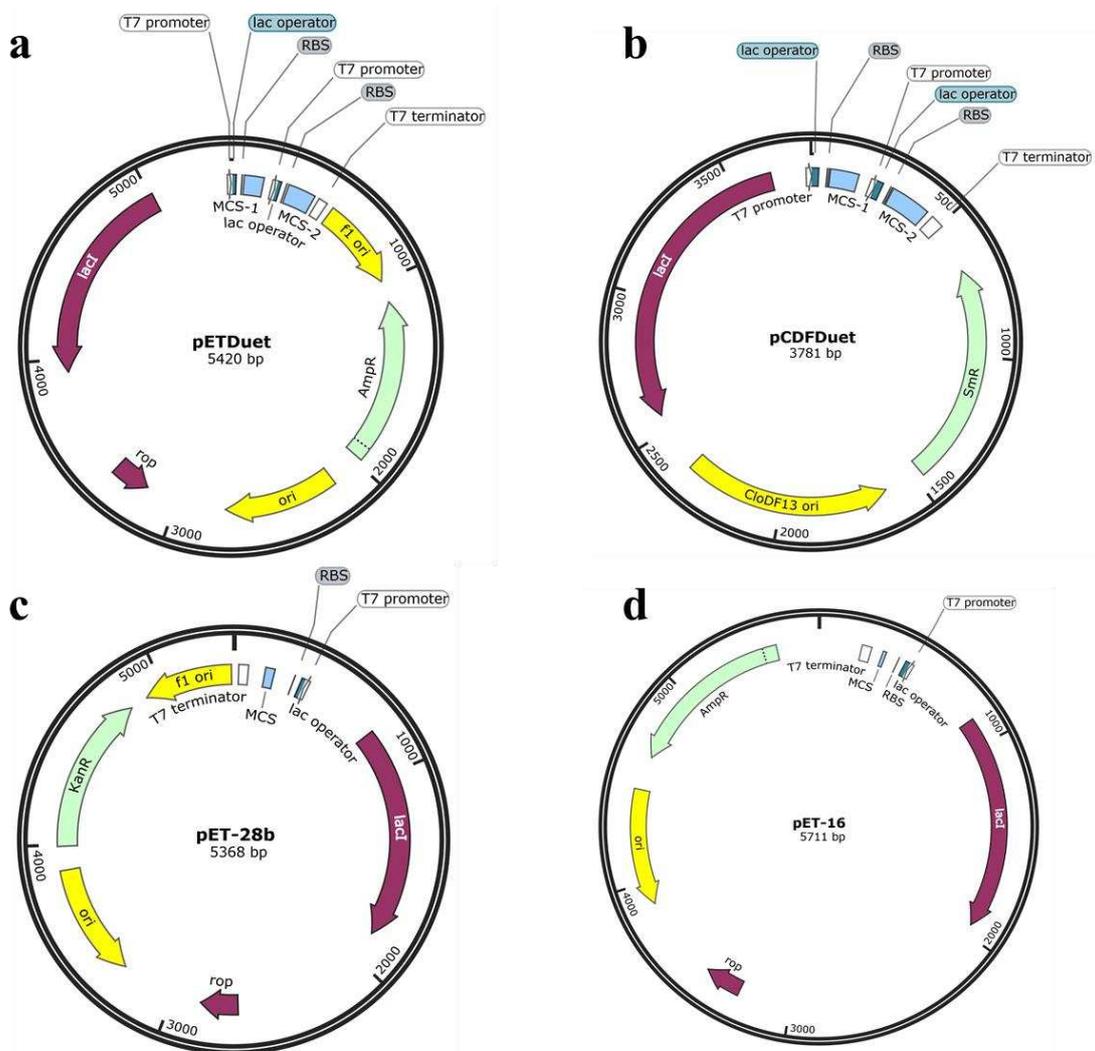


Figure 30 Carte des plasmides utilisés pour la surexpression des protéines de la machinerie ISC de *M. musculus*. (a) Carte du plasmide pETDuet de ISCU et ces mutants. (b) Carte du plasmide pCDFDuet du complexe NFS1-ISD11. (c) Carte du plasmide pET-28b de FDX2 (*H. sapiens*). (d) Carte du plasmide pET-16 pour la FXN. Les plasmides possèdent tous un promoteur et un terminateur pour

Matériels et méthodes

la polymérase ARN T7 (en blanc), un site de liaison du ribosome RBS (en gris), un ou deux sites multiples de clonage MCS aussi appelé polylinker (en bleu) où se situe notre protéine d'intérêt, une origine indépendante de réplication (en jaune), un gène de résistance à un antibiotique (en vert turquoise) (AmpR : Ampicilline ; SmR : Spectinomycine ; KanR : Kanamycine), un gène répresseur *lac* pour inhiber la transcription chez *E. coli* en absence d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (en violet). Les cartes des plasmides ont été réalisées avec le logiciel SnapGene.

Toutes les informations concernant les plasmides des gènes codant les protéines d'intérêt utilisées durant ma thèse sont détaillées dans le tableau ci-dessous :

Protéine d'intérêt	Organisme	Vecteur	Résistance antibiotique	Etiquette	Site de clivage	Provenance
ISCU	<i>M. musculus</i>	pETDuet	Ampicilline	6 x His (N-ter)	Thrombine	Plateforme IMAGIF (Gif-Sur-Yvette, France)
ISCU C104S						
ISCU C35S						
ISCU D37A						
ISCU C61A						
ISCU H103A						
ISCU M106I						
NFS1-ISD11		pCDFDuet	Spectinomycine			LEBS (Gif-Sur-Yvette, France)
FXN		pET-16	Ampicilline			
FDX2	<i>H. sapiens</i>	pET-28b	Kanamycine		GenScript (Piscataway, USA)	
IscU	<i>E. coli</i>	pVP67K				8 x His (C-ter)
IscU I106M						
IscS		pET-11a	Ampicilline			
CyaY						
Fdx		pDEST24	Ampicilline + Chloramphénicol			

Matériels et méthodes

FdxR		pET-11a				
Isu1	<i>C. thermophilum</i>	pET-21d	Ampicilline	6 x His (C-ter)		
ISCU	<i>H. sapiens</i>	pET-29a	Kanamycine	6x His (N-ter)	Thrombine	Gene Universal (Delaware, USA)

Tableau 2 Tableau récapitulatif des protéines et de leurs vecteurs utilisés durant ma thèse.

1.2 Souches bactériennes

Afin de réaliser des stocks de plasmides, nous utilisons au laboratoire la bactérie *E. coli*, notamment deux souches DH5 α et TOP10. Ces deux souches permettent d'obtenir une quantité de plasmide satisfaisante de l'ordre de 100 à 300 ng/ μ L en partant d'une pré-culture de 5 mL de milieu LB (**L**ysogeny **B**roth).

Afin de surexprimer nos protéines d'intérêt de *M. musculus*, nous utilisons au laboratoire la souche de la bactérie *E. coli* Rosetta2 DE3 (Novagen®). Cette souche est particulièrement efficace pour surexprimer des protéines eucaryotes qui possèdent des codons « rares » que l'on ne retrouve pas chez les procaryotes (codons rares : AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG).

1.3 Transformation bactérienne

20 μ L de bactéries compétentes DH5 α , TOP10 ou Rosetta2 DE3 sont décongelées dans la glace 10 minutes. 5 μ L d'ADN plasmidique à 2 ng/ μ L sont ajoutés aux bactéries compétentes et le mélange est incubé dans la glace 15 minutes. Un choc thermique à 42°C durant 45 secondes est réalisé afin de déstabiliser la bicouche lipidique pour faire entrer l'ADN plasmidique. Le mélange est par la suite ré-incubé dans la glace durant 5 minutes. 200 μ L milieu de croissance bactérien SOC sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C durant 1 heure sous agitation à 250 rpm. Durant cette incubation, les boîtes de Petri préalablement coulées avec du LB-Agar supplémenté des antibiotiques adéquats sont préchauffées à 37°C. Le mélange est étalé sur les boîtes de Petri à l'aide d'un râteau avant d'être incubé à 37°C pendant la nuit.

Matériels et méthodes

2. Production et purification des protéines recombinantes

2.1 Production des protéines recombinantes

Lors de ma thèse, uniquement les protéines de la machinerie ISC de *M. musculus* ont été purifiées ainsi que ISCU de *H. sapiens*. La protéine FDXR humaine a été fournie par le Dr Roland Lill (Marbourg, Allemagne) et les protéines bactériennes par le Dr Dutkiewicz (Gdansk, Pologne).

2.1.1 Milieu de culture

Le milieu utilisé pour la production des protéines est le milieu LB (Lysogeny Broth). Ce milieu est composé de 10 g/L tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de chlorure de sodium.

2.1.2 Surexpression des protéines d'intérêts

Une colonie de la boîte de Petri contenant la souche *E. coli* Rosetta2 DE3 avec le plasmide d'intérêt est prélevée et mise en suspension dans une pré-culture de 300 mL de milieu LB supplémenté des antibiotiques adéquats. Cette pré-culture est incubée à 37°C pendant la nuit sous agitation à 250 rpm. Cette pré-culture en phase stationnaire va permettre d'inoculer 6 L de milieu LB fraîchement préparé à une $DO_{600nm} = 0,1$. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,7 correspondant à une phase exponentielle de croissance. A cette densité optique, les bactéries sont dans des conditions favorables pour surexprimer les protéines d'intérêts. La surexpression est induite par l'ajout d'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 1 mM. L'IPTG va permettre de lever la répression exercée par le répresseur de l'opéron lactose LacI pour induire la surexpression des protéines d'intérêts. Les cultures sont alors incubées à 37°C durant 3 heures pour ISCU, FDX2 et FXN, et à 18°C pendant la nuit pour le complexe NFS1-ISD11-ACP, sous agitation à 250 rpm. Les cultures sont récupérées par centrifugation à 5500 rpm durant 10 minutes. Les culots sont conservés à -80°C avant la purification.

2.2 Purification des protéines recombinantes

2.2.1 Extraction protéique

Les culots de bactéries sont resuspendus dans du tampon A (20 mM Tris, 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH : 8,0) supplémenté d'une pastille d'inhibiteur de protéase (1 pastille pour 100 mL). Les culots de bactéries surexprimant ISCU sont supplémentés par 100 mM de sulfate de zinc $ZnSO_4$. Les bactéries sont lysées en utilisant une French Press. Le lysat cellulaire est centrifugé durant 45 minutes à

Matériels et méthodes

45000 rpm et 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et le culot contenant les débris cellulaires et les protéines insolubles est jeté.

2.2.2 Chromatographie d'affinité métallique immobilisé

Toutes les protéines de la machinerie ISC de *M. musculus* possèdent une étiquette 6xHis au niveau de leur N-terminal. Cette étiquette est nécessaire afin de réaliser une première étape de purification sur colonne de nickel (HiTrap Chelating HP 5mL, GE Healthcare). La colonne de nickel est préalablement équilibrée avec le tampon **A** et le surnageant contenant les protéines solubles est chargé sur la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique. La colonne est par la suite extensivement lavée avec plusieurs volumes de colonne de tampon **A** et les protéines liées à la colonne sont éluées par un gradient linéaire de tampon **B** (20 mM Tris, 250 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH : 8,0) à l'aide d'une AKTA purifier (GE Healthcare). Les fractions récupérées sont analysées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium DodécylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Les fractions les plus pures sont mélangées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'Amicon® Ultra 15 mL (MILLIPORE) avec un « cut-off » adapté à la protéine purifiée.

2.2.3 Clivage de l'étiquette 6xHis

Avant de cliver l'étiquette 6xHis des protéines, l'extrait protéique fraîchement purifié est concentré et dessalé dans du tampon **C** (20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH : 8,0) par gel filtration avec des colonnes Sephadex™ G-25 M ou PD-10 (GE Healthcare) afin d'éliminer l'excès d'imidazole. La concentration de l'extrait protéique est déterminée par un dosage Bradford afin de calculer la quantité de thrombine nécessaire pour le clivage de l'étiquette 6xHis. Après ajout de la thrombine, l'extrait protéique est incubé pendant la nuit à température ambiante. Le complexe NFS1-ISD11-ACP n'est pas clivé par la thrombine car nous avons observé des coupures non-spécifiques par la thrombine.

2.2.4 Chromatographie d'exclusion de taille

Avant de réaliser une dernière étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille, les protéines ISCU et NFS1 sont incubées avec du DTT pour éliminer toutes traces de persulfure et réduire tous les résidus cystéines. Le complexe NFS1-ISD11-ACP est incubé 1 heure à température ambiante avec 50 équivalents de DTT et 2 équivalents de PLP et ISCU est incubée 1 heure à température ambiante avec 50 équivalents de DTT. Pour la préparation de la forme apo protéine d'ISCU, la protéine ISCU est incubée pendant 2 heures avec 150 équivalents de DTPA (acide Diéthylène Triamine Penta Acétique) afin d'éliminer tous le zinc présent dans la protéine. Le complexe NFS1-ISD11-ACP est

Matériels et méthodes

injecté à l'aide de l'AKTA purifier sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare) et les protéines ISCU, FXN et FDX2 sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare). Les colonnes sont préalablement équilibrées avec du tampon C et dans le cas d'apo-ISCU le tampon C est supplémenté par 10 mM DTT afin de maintenir les cystéines sous forme réduite. Les fractions récoltées sont analysées par SDS-PAGE. Les fractions contenant les protéines d'intérêt sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration avec des Amicon® Ultra 15 mL jusqu'à volume de 500 µL.

2.2.5 Préparation des échantillons en conditions anaérobie

Après concentration les échantillons sont introduits dans une boîte à gants Jacomex ($O_2 < 2$ ppm) et laissés à dégazer sur la nuit à 10°C. Dans le cas d'apo-ISCU, la protéine est d'abord dessalée dans du tampon D (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH : 8,0) sur une colonne Sephadex™ G-25 Medium ou Nap-5 (GE Healthcare) afin d'enlever le DTT. Puis la protéine est reconcentrée par ultrafiltration à l'aide d'Amicon® Ultra 500 µL (MILLIPORE). Pour le stockage, les échantillons protéiques sont supplémentés par 10 % glycérol, aliquotés dans des tubes à vis avec joint torique et rapidement congelé dans l'azote liquide. Les aliquots sont conservés dans un tank d'azote liquide ($\sim -180^\circ\text{C}$).

2.2.6 Détermination de la concentration des protéines

Les concentrations finales des échantillons sont déterminées par UV-visible à 278 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Secomam UVIKON_{XL} dans du tampon E (100 mM Tris, 8 M urée, pH : 7,5) en utilisant les coefficients d'extinction molaires 52260, 9970, 26930, 13980 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le complexe NFS1-ISD11-ACP, ISCU, FXN et FDX2 respectivement, déterminés sur la base du nombre de tryptophanes, de tyrosines et de phénylalanines. La concentration du complexe NFS1-ISD11-ACP est doublement vérifiée avec la concentration en PLP possédant un coefficient d'extinction molaire à 420 nm de 5000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Les purifications des différents mutants des protéines ISCU/IscU ont été réalisées de manière similaire à la protéine sauvage.

Matériels et méthodes

3. Méthodes Biochimiques

3.1 Cinétique d'assemblage des centres Fe-S

Les cinétiques d'assemblage des centres Fe-S sont réalisées en anaérobie dans des conditions catalytiques ou stœchiométriques.

Conditions catalytiques : 100 μM de Fe^{2+} (sel de Mohr) est incubé avec 100 μM apo-ISCU/apo-IscU mélangé avec 10 μM de complexe NFS1-ISD11-ACP/IscS, 10 μM de FDX2/Fdx, 5 μM de FDXR/FdxR et 200 μM de NADPH dans le tampon **D**.

Conditions stœchiométriques : 100 μM de Fe^{2+} (sel de Mohr) est incubé avec 100 μM apo-ISCU/apo-IscU mélangé avec 100 μM de complexe NFS1-ISD11-ACP/IscS, 100 μM de FDX2/Fdx, 50 μM de FDXR/FdxR et 200 μM de NADPH dans le tampon **D**.

Les mélanges sont transférés dans une cuvette en quartz scellée par un bouchon. Les réactions sont initiées par l'ajout de 100 μM de L-cystéine préalablement prélevé en boîte à gant à l'aide d'une seringue Hamilton étanche. Les cinétiques d'assemblage sont suivies par UV-visible à 456 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Secomam UVIKON_{XL}.

3.2 Méthode d'alkylation des persulfures

Afin de visualiser la formation du persulfure de NFS1-ISD11-ACP, le transfert de persulfure sur ISCU ou la réduction de son persulfure par la ferrédoxine au cours du temps nous utilisons une méthode d'alkylation appelé ARBS (le principe de la technique sera extensivement décrit dans le chapitre 3). Les protocoles pour les protéines de *M. musculus* sont présentés ici mais sont totalement identiques pour les protéines d'*E. coli*.

Pour ce test, nous utilisons des agents alkylant de la famille des maléimides. Ces agents réagissent préférentiellement avec les sulfures nucléophiles des cystéines et des persulfures, mais également avec les amines. Bien que cette dernière réaction soit lente, le tampon Tris doit être échangé par un autre tampon car il est présent à forte concentration (20 mM) et dans ces conditions la réaction avec les maléimides n'est plus négligeable en comparaison de celle avec les thiols et les persulfures des protéines qui sont eux présents à des concentrations totales de l'ordre de 100 – 200 μM dans nos réactions. Le tampon Tris a été échangé par du tampon phosphate par dessalage sur colonne BioSpin dans du tampon **F** (50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH : 8,0). Nous avons par ailleurs vérifié que la réaction d'assemblage fonctionne dans ce tampon.

Les protéines (ISCU/IscU, NFS1-ISD11-ACP/IscS, FDX2/Fdx, FXN/CyaY) sont utilisées à une concentration finale de 20 μM dans le tampon F puis incubées avec de la L-cystéine pour suivre la

Matériels et méthodes

formation ou le transfert de persulfure. Nous avons également réalisé des expériences dans lesquelles la forme persulfurée de IscS ou NFS1-ISD11-ACP est préalablement préparée puis dessalée et ajoutée à ISCU/IscU, afin de dissocier la formation du transfert de persulfure. Dans le cas du suivi de réduction de persulfure, le complexe persulfuré est préalablement préparé par incubation avec de la L-cystéine puis FDX2/Fdx est ajoutée ainsi que 10 μ M de FDXR et 40 μ M de NADPH.

Pour chaque type d'expérience, 15 μ L de complexe sont prélevés à différents temps et incubés avec 2 équivalents molaires de maléimide par rapport au nombre total de thiols présents dans la réaction (incluant tous les résidus cystéines des protéines et la L-cystéine libre). Nous avons utilisé deux types de maléimide : un maléimide auquel a été greffé un peptide de 16 acides aminés conduisant au composé MalP16 de poids moléculaire de 1,95 kDa (voir structure dans **article #1**), qui nous a été fourni via une collaboration (Anna Grandas, Université de Barcelone) et un maléimide commercial greffé à une chaîne polyéthylène glycol, appelé maléimide-dPEG de poids moléculaire 2,36 kDa (voir structure dans **article #1**). La réaction avec les maléimides est réalisée en présence de 2,7 % SDS et 360 μ M de EDTA durant 30 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite incubé avec 10 μ L de bleu de bromophénol contenant du β -mercaptoéthanol durant 30 minutes à température ambiante. Pour les expériences réalisées en conditions non-réductrices, le β -mercaptoéthanol est omis. Pour visualiser la formation du persulfure sur le complexe NFS1-ISD11-ACP et sur IscS, 50 pmoles de complexe ou de protéine sont déposés sur gel d'électrophorèse 10 %. Pour visualiser le transfert et la réduction du persulfure sur ISCU/IscU, 200 pmoles d'IscU ou ISCU sont déposés sur gel d'électrophorèse 14 %. La migration du gel se fait à 90 V durant 2 ou 5 heures pour un gel 14 ou 10 % respectivement. Les protéines sont révélées par une coloration du gel au bleu de Coomassie suivi par une décoloration par une solution contenant 10 % acide acétique, 10 % éthanol et 80 % eau. Le gel est scanné à l'aide d'un imageur Odyssey.

3.3 Quantification du zinc dans ISCU

Pour mesurer le zinc dans ISCU/IscU nous avons utilisé deux techniques différentes. Dans un premier temps, ISCU *M. musculus* fraîchement purifié a été analysé par spectrométrie de masse couplé à un plasma inductif (ICP-MS) en partenariat avec IRAMIS (CEA Saclay). Pour les mesures de routine, nous avons utilisé une méthode colorimétrique avec du 2-(4-pyridylazo) résorcinol (PAR), en mesurant l'absorbance du complexe Zn-PAR à 500 nm. Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage est réalisée à 500 nm en incubant une solution de sulfate de zinc à des concentrations comprises entre 0 – 10 μ M, avec 100 μ M de PAR dans un tampon 150 mM Tris, 8 M urée à pH : 7,5. Le zinc dans les protéines ISCU/IscU est mesuré dans le même tampon avec cinq concentrations différentes en protéines.

Matériels et méthodes

4. Méthodes biophysiques

4.1 Dichroïsme circulaire

Le principe de la technique est présenté en Annexe#1.

Contrôle qualité des ISCU *M. musculus* et IscU *E. coli*: Nous avons utilisé cette technique afin de contrôler la qualité des protéines ISCU/IscU après purification. En effet l'entrée de métal permet le repliement de la protéine, si la protéine est endommagée, agrégée ou irréversiblement dépliée le métal ne peut pas rentrer et il n'y a pas de signal CD. La détection des absorptions LMCT (**L**igand to **M**etal **C**harge **T**ransfer) par CD permet de quantifier la concentration de métal insérée dans la protéine et par conséquent quantifier la concentration de protéine correctement repliée. Après chaque purification 100 μM de Fe^{2+} (sel de mohr) sont incubés avec 100 μM d'ISCU *M. musculus* ou IscU *E. coli* dans du tampon **D**. Les mélanges sont préparés en aérobie au sein de la boîte à gants et sont transférés dans une cuvette en quartz scellée par un bouchon puis les spectres sont acquis à l'aide d'un spectrophotomètre de CD JASCO J-815.

Titration en fer dans ISCU *M. musculus* et IscU *E. coli*: Une solution de sel de mohr Fe^{2+} est préalablement préparée à une concentration de 5 mM dans de l'eau mili-Q. Par la suite différents équivalents (de 0 équivalent à 3 équivalents par paliers de 0,25 équivalents) de Fe^{2+} sont incubés à 100 μM d'ISCU *M. musculus* ou IscU *E. coli* dans du tampon **D**. Les mélanges sont préparés en anaérobie au sein de la boîte à gants et sont transférés dans une cuvette en quartz scellée par un bouchon. Les spectres de CD sont réalisés à l'aide du spectrophotomètre.

4.2 La spectroscopie Mössbauer

Le principe de la technique est présenté en Annexe#2.

Les échantillons Fe-ISCU ont été préparés en incubant 1 mM ou 2 mM d'ISCU *M. musculus* (WT, C104S, H103A, M106I) et IscU *E. coli* (WT) avec entre 0,5 et 1 équivalent de sel de mohr $^{57}\text{Fe}^{2+}$ dans un volume final de 350 μL contenant du tampon **D**. L'échantillon d'ISCU après reconstitution de centres Fe-S a été préparé en incubant dans un volume final de 350 μL : 2 mM $^{57}\text{Fe}^{2+}$, 1 mM d'ISCU *M. musculus*, 5 μM de complexe NFS1-ISD11-ACP, 5 μM de FXN, 5 μM de FDX2, 1 μM de FDXR, 2 mM NADPH et 2 mM de L-cystéine dans du tampon **D** durant 1 heure. Les échantillons sont préparés en aérobie en boîte à gant et sont transférés dans une cuvette spécifique pour la spectroscopie Mössbauer et rapidement congelés dans un bloc préalablement refroidi avec de l'azote liquide. Les échantillons sont stockés à -80°C avant leurs envois chez notre collaborateur en Allemagne.

Matériels et méthodes

4.3 La spectroscopie RMN

Le principe de la technique est présenté en Annexe#3.

Pour les échantillons RMN 2D SOFAST-HMQC ^1H - ^{15}N de ISCU sous formes apo ou avec Fe^{2+} un marquage ^{15}N a été préalablement réalisé par Djabir Larkem étudiant en master 2 dans le laboratoire. 100 μM d'apo-ISCU *M. musculus* ont été incubées en absence ou en présence de 100 μM de Fe^{2+} (sel de mohr) dans un volume final de 200 μL contenant du tampon **D** supplémenté par 7 % de $^2\text{H}_2\text{O}$ et 1 μL de DSS (standard d'étalonnage en RMN). Les échantillons préparés en absence de fer ont été transférés dans des tubes RMN de 3 mm et ceux contenant du fer dans des tubes RMN de 3 mm hermétiques grâce à un bouchon à vis avec joint torique. Les spectres sont obtenus à l'aide d'un spectromètre RMN de 800 MHz. Des échantillons ont également été préparés en présence d'un équivalent de complexe NFS1-ISD11-ACP (NIA) et les spectres ont été obtenus par la même procédure.

Pour étudier la formation des complexes NIAU, NIUAF, IscS-IscU et IscS-IscU-Fdx des expériences de RMN 1D ont été réalisées qui ne nécessite aucun marquage spécifique. Pour le complexe NIAUF de *M. musculus*, des titrations de FXN par rapport au complexe NIAU ont été réalisées en présence ou absence de zinc. 50 μM de complexe NIAU a été incubé en présence ou non d'un équivalent de zinc en faisant varier la concentration en FXN dans un volume final de 200 μL contenant du tampon **D** supplémenté par 7 % $^2\text{H}_2\text{O}$. Ces spectres ont permis de déterminer une constante de dissociation (K_D) de la FXN pour le complexe NIAU. Pour l'étude des complexes IscS-IscU et IscS-IscU-Fdx et l'effet du fer, les spectres RMN de chaque protéine seule ainsi que celui du complexe Fe-IscU-IscS-Fdx-FdxR ont été obtenus en incubant 100 μM de protéine ou de complexe dans un volume final de 200 μL contenant du tampon **D** supplémenté par 7 % $^2\text{H}_2\text{O}$ et par 1,2 équivalents de NADPH lorsque Fdx-FdxR sont présentes. Les spectres RMN du complexe après reconstitution de centres Fe-S ont été obtenus en incubant 100 μM de complexe avec 1 équivalent de L-cystéine, 1,2 équivalents de NADPH en présence ou absence de 10 équivalents de Fe^{2+} dans un volume final de 200 μL contenant du tampon **D** et supplémenté par 7 % $^2\text{H}_2\text{O}$. Ces spectres ont été obtenus à l'aide du spectromètre RMN 800 MHz.

4.4 La spectrométrie de masse

Le principe de la technique est présenté en Annexe#4

Spectrométrie de masse dénaturante : Les analyses par spectrométrie de masse (MS) à ionisation par électrobulbation (nanoESI-MS) ont été effectuées sur un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (Synapt G2 HDMS, Waters) équipé d'une technologie automatisée d'ionisation par électrobulbation sur puce (Triversa Nanomate, Advion) en mode ion positif. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, les échantillons ont été soumis à un échange de tampon avec de l'acétate d'ammonium 10 mM (AcONH_4) à pH 7,0 à l'aide de colonnes de gel filtration Biospin. Pour

Matériels et méthodes

l'analyse MS dénaturante, l'étalonnage externe a été effectué en utilisant une solution de myoglobine de cœur de cheval dénaturée à 2 μM comme standard pour l'analyse dénaturante dans les spectres de masse de la gamme 500-5000 m/z. Le temps d'acquisition des données et le temps de balayage ont été fixés à 2 minutes et 4 secondes, respectivement. Les différents échantillons (Fe-ISCU incubée avec le complexe NIA en présence ou absence de 1 équivalent de L-cystéine, et un échantillon après un assemblage de centres Fe-S) échangés en tampon ont été dilués à 10 μM dans un mélange eau:acétonitrile (1:1) acidifié avec 1% d'acide formique. Les analyses MS dénaturantes ont été réalisées avec une tension d'accélération de 40 V et la contre-pression de l'instrument a été fixée à 1,7 mbar. Les spectres de masse ont été déconvolués avec MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, Royaume-Uni) en utilisant le module MaxEnt 1 avec les paramètres suivants : gamme m/z : 600-3000 ; lissage gaussien : 2 ; plage de masse : 14 500-15 000 Da, nombre d'itérations : 30 ; soustraction : 20-40%.

Spectrométrie de masse native : Pour l'analyse par spectrométrie de masse native, des ions de cluster d'iodure de césium provenant d'une solution d'isopropanol:eau (1:1) de 2 g/L ont été utilisés pour calibrer le spectromètre de masse jusqu'à 6000 m/z. Les échantillons (un échantillon après un assemblage de centres Fe-S avec la machinerie eucaryote ; plusieurs échantillons durant un assemblage de centres Fe-S avec la machinerie procaryote) ont été dilués à 10 μM dans de l'acétate d'ammonium 10 mM (AcONH_4) à pH 7,0. Le temps d'acquisition des données et le temps de balayage ont été fixés à 2 minutes et 4 secondes, respectivement. Afin d'éviter la dissociation de l'interaction protéique du centre Fe-S, les analyses dans des conditions natives ont été réalisées avec une tension d'accélération de 40 V et la contre-pression de l'instrument a été fixée à 6 mbar. Les spectres de masse ont été acquis avec MassLynx 4.1 et traités avec les paramètres suivants : gamme m/z : 1500-4000 ; lissage gaussien : 10.

4.5 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Le principe de la technique est présenté en Annexe#5

Les échantillons RPE ont été préparés en mélangeant des apo-ISCU monomères de *M. musculus* WT, C104S et H103A (0,7 - 1 mM) avec différents équivalents (de 0,5 - 0,7) de Fe^{2+} dans des tampons Tris ou phosphate contenant 10% de glycérol jusqu'à un volume final de 180 μL . Les échantillons de Fe-IscU d'*E.coli* ont été préparés en mélangeant 0,5 mM d'IscU avec 0,5 mM de Fe^{2+} et de reconstitutions en conditions stœchiométriques en mélangeant 0,25 mM d'IscU, IscS, Fdx, FdxR, Fe^{2+} , L-cystéine avec 0,12 ou 0,5 mM NADPH dans du tampon Tris supplémenté par 10% glycérol jusqu'à un volume de 180 μL . Les échantillons ont été transférés dans des tubes RPE en quartz calibrés, puis scellés avec un septum avant d'être congelés dans l'azote liquide. Les expériences de spectroscopie RPE ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Elexsys E500 équipé d'un flux d'hélium-gaz Oxford

Matériels et méthodes

Instruments ESR-900 pour les études à température cryogénique et monté avec un résonateur bimode Bruker (ER 4116DM). Les spectres ont été obtenus en mode parallèle enregistré en bandes X à une fréquence de micro-onde de 9,4 GHz, à 7K (sous hélium liquide), avec une puissance de micro-onde de 10 mW avec une modulation de 10G.

Chapitre 3 Préparation des protéines et des complexes

Pour pouvoir étudier les processus d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC mitochondriale de *M. musculus* et la machinerie ISC d'*E. coli* nous avons purifié toutes les protéines individuellement afin de reconstituer les complexes et réaliser des réactions d'assemblage. Nous verrons dans ce premier chapitre la purification des protéines de la machinerie ISC de *M. musculus* : NFS1-ISD11-ACP, ISCU, FDX2 et FXN. Les protéines recombinantes issues de la bactérie *E. coli* nous ont été fournies via une collaboration avec Rafal Dutkiewicz (Université de Gdansk, Pologne). Dans une seconde partie, je décrirai la méthode d'alkylation ARBS, qui est une technique centrale utilisée durant toute ma thèse pour suivre les persulfures.

1. Purification des protéines

1.1 Purification de la cystéine désulfurase NFS1

La cystéine désulfurase NFS1 est une protéine très peu soluble en absence de ces deux partenaires ISD11 et ACP. Nous avons dans un premier temps surexprimé le complexe murin NFS1-ISD11 sans surexprimé ACP. En effet, la résolution des structures cristallographiques de NFS1-ISD11 et du complexe NFS1-ISD11-ISCU ont montré que la surexpression de NFS1-ISD11 chez *E. coli* permet de récupérer un complexe NFS1-ISD11 avec la protéine ACP d'*E. coli* (Cory & al, 2017 ; Boniecki & al, 2017). Nous avons dans un premier temps testé la surexpression du complexe NFS1-ISD11 dans différents milieux riches (LB et TB) et pauvres (M9) (**Figure 31**). Quel que soit le milieu utilisé, la protéine est majoritairement retrouvée dans le culot notamment sous la forme de corps d'inclusion à un poids moléculaire compris entre 40 et 55 kDa correspondant bien à la taille attendue. Il est difficile de distinguer la présence de NFS1 ou de ISD11 dans le surnageant. Nous avons également testé différentes techniques de lyse, sonication et presse de French, mais cela n'a pas permis d'augmenter la quantité de protéines solubles.

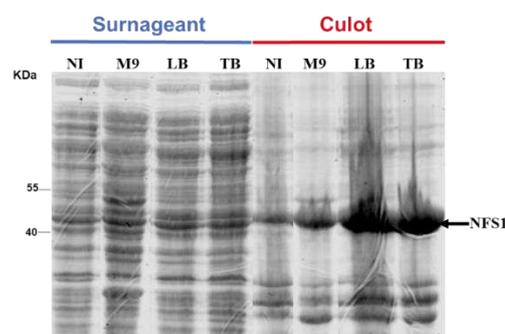


Figure 31 Test d'expression du complexe NIA. Le complexe NIA a été surexprimé dans différents milieux : un milieu LB avant et après induction (NI-LB), un milieu TB (TB) et un milieu M9 (M9).

Préparation des protéines et des complexes

Après centrifugation du lysat bactérien, les surnageants et les culots de chaque milieu sont analysés sur un gel SDS-PAGE 10 %.

Nous avons finalement trouvé que les meilleures conditions permettant de limiter la formation de corps d'inclusion étaient de cultiver les cellules à basse température sur la nuit (18°C, 18 h) en milieu LB. Après la surexpression des protéines NFS1 et ISD11 dans 6 L de culture LB et la lyse bactérienne, une première étape de purification d'affinité sur une colonne de nickel est réalisée. Nous avons suivi l'éluion des protéines à 280 nm et également à 420 nm pour détecter la présence du cofacteur PLP de NFS1. Le chromatogramme de purification montre la présence de deux pics d'absorption à 280 nm entre 10 et 33 mL présentant également des pics d'absorption à 420 nm (**Figure 32a**). L'analyse par SDS-PAGE des fractions (zone rose claire du chromatogramme) montre bien la présence de NFS1 (45 kDa) et ISD11 (11 kDa) aux tailles attendues (**Figure 32b**). Après cette première étape, la protéine n'est pas assez pure pour réaliser nos expériences et nécessite une étape supplémentaire de purification.

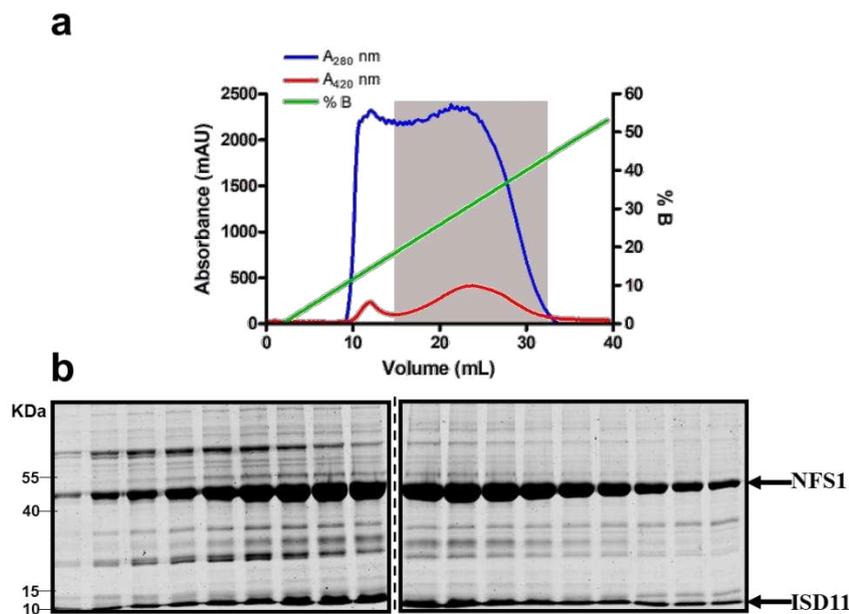


Figure 32 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel du complexe NFS1-ISD11-ACP_{Ec}. (a) Chromatogramme de purification suivie par l'absorbance à 280 (courbe bleue) et 420 (courbe rouge) nm. Le pourcentage de tampon d'éluion B est représenté en vert. La zone rose claire correspond aux fractions contenant le complexe NIA. (b) Gel SDS-PAGE 12 % des fractions correspondant à la zone rose claire du chromatogramme.

L'étiquette 6xHis de NFS1 n'est pas clivée car la thrombine génère des coupures non spécifiques de la protéine. Après un traitement par 50 équivalents de DTT durant 1 heure afin de réduire tous les résidus cystéines, une seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille est réalisée sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade. Le chromatogramme montre la présence de deux pics à 45 mL et 68 mL présentant tous deux des absorbances à 280 et 420 nm (**Figure**

Préparation des protéines et des complexes

33). Le pic à 45 mL correspond à des formes oligomériques probablement agrégées car il contient à la fois NFS1 et ISD11 mais aussi d'autres protéines (non montré), cette fraction n'a donc pas été retenue. Les fractions du pic à 68 mL présentent une couleur jaune caractéristique du cofacteur PLP. L'analyse par SDS-PAGE de ces fractions montre la présence de NFS1 et ISD11 (**Figure 33**). La protéine ACP_{Ec} est extrêmement difficile à détecter sur un gel SDS-PAGE, elle apparaît sous forme d'une bande de très faible intensité vers 10 kDa correspondant à sa taille attendue de 9.2 kDa avec son cofacteur 4'-Phosphopantetheinyl (PPT) et sa chaîne d'acyle de 12 carbones. Malgré la présence de contaminants entre 10 et 15 kDa, la protéine est pure à environ 90 % ce qui est suffisant pour nos études biochimiques. Le volume d'éluion du complexe NFS1-ISD11-ACP_{Ec} est compatible avec un état dimérique (NFS1-ISD11-ACP_{Ec})₂. Cependant, le rendement de purification est très faible, de l'ordre de 0,5 à 1 mg de protéines par litre de culture.

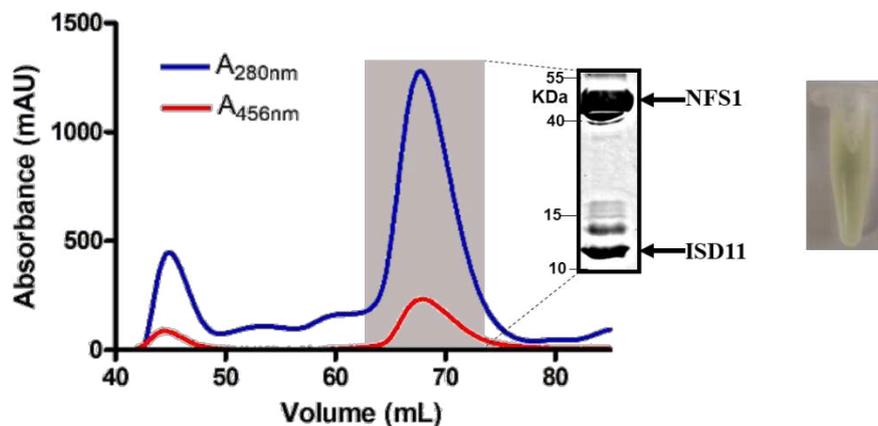


Figure 33 Chromatographie d'exclusion de taille du complexe NFS1-ISD11-ACP_{Ec}. Chromatogramme de purification suivie à une absorbance de 280 (courbe bleue) et 420 (courbe rouge) nm. La zone rose claire correspond à la forme dimérique du complexe NFS1-ISD11-ACP_{Ec}. Le gel SDS-PAGE 16 % correspond aux fractions réunies de la forme dimérique.

Nous avons par la suite voulu améliorer le rendement de purification du complexe NIA. Pour cela, nous avons directement surexprimé les trois protéines NFS1, ISD11 et ACP_{Mm}. Cependant, la co-expression des trois protéines de *M. musculus* n'a pas fonctionné car la croissance bactérienne était très limitée. Nous avons alors pensé que la surexpression d'ACP pouvait être toxique pour la bactérie *E. coli*. Cependant, la surexpression de la protéine ACP seule provenant de *M. musculus* ou *H. sapiens* n'est pas toxique pour la bactérie *E. coli* et nous avons obtenu des quantités raisonnables de protéines après purification (**Figure 34 a,b**). De plus, très récemment Beata Monfort, postdoc au laboratoire est parvenue à co-exprimer les trois protéines humaines et à obtenir un complexe NFS1-ISD11-ACP avec des rendements améliorés d'un facteur 3 environ par rapport à NFS1-ISD11-ACP_{Ec}. Il semble donc que le problème d'expression des trois protéines de souris soit spécifique au système souris pour une raison

Préparation des protéines et des complexes

inconnue. En l'absence de complexe murin NFS1-ISD11-ACP, nous avons travaillé avec le complexe NFS1-ISD11-ACP_{Ec} tout au long de ma thèse.

Nous avons également cherché à déterminer la taille de la chaîne acyle fixée à ACP. En effet, les structures du complexe NIAU montre une chaîne acyle de 12 carbones mais les analyses par spectrométrie de masse ont montré la présence de différentes chaînes jusqu'à 16 carbones (Cory & al, 2017 ; Boniecki & al, 2017). Nous avons donc exprimé et analysé les protéines ACP_{Hs} et ACP_{Mm} par spectrométrie de masse (MS). L'analyse SDS-PAGE des protéines ACP_{Mm} et ACP_{Hs} montre des bandes correspondant à des poids moléculaires respectifs de 14 kDa et 13 kDa. L'analyse MS montre qu'ACP_{Hs} est présente sous forme monomérique et dimérique tandis qu'ACP_{Mm} est uniquement présente sous forme dimérique (**Figure 34 c,d**). Ces formes dimériques peuvent être réduites par du DTT ce qui indique la présence de ponts disulfures intermoléculaires. Pour les analyses des masses exactes, nous avons pris en compte de la présence du groupement 4'-phosphopantetheine (PPT) d'une masse de 358 Da attaché à ACP via son résidu sérine 42, ainsi que la présence du thioacyl sur PPT qui s'accompagne par la perte d'un oxygène sous forme : ACP-PPT-S-C(O)-(CH₂)_n-CH₃. L'analyse des spectres de masse des formes monomériques réduites d'ACP_{Hs} et ACP_{Mm} montre la présence de deux formes, chacune comportant leur cofacteur PPT, mais l'une sans chaîne acyle et l'autre avec (**Tableau#3-4**). Les masses sont compatibles avec des chaînes C12 (n = 10) présentant des défauts de masse de 4 à 5 Da pouvant correspondre à deux insaturations en doubles liaisons C=C. Au final, ces résultats montrent que la surexpression de ces ACP produit une seule longueur de chaîne qui est compatible avec la taille permettant l'interaction avec ISD11. C'est donc peut-être la présence exclusive d'une forme oxydée pour ACP_{Mm} qui pourrait expliquer le défaut de croissance lorsque les trois protéines murines sont co-exprimées.

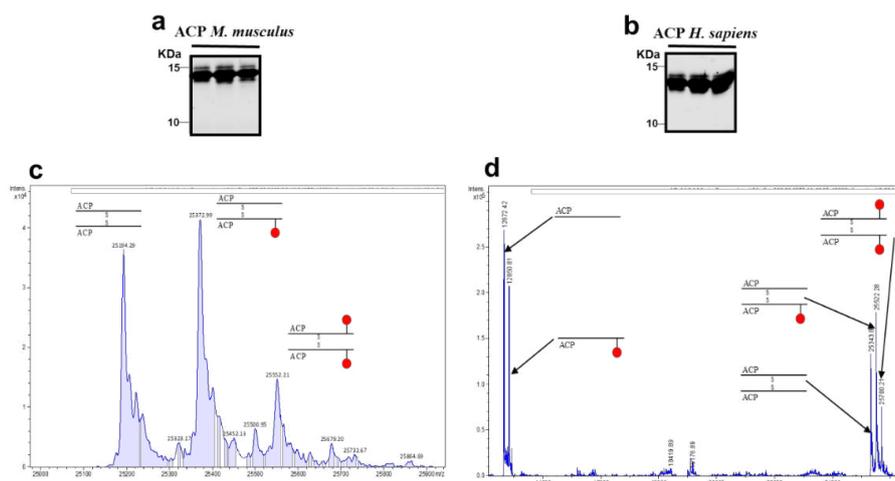


Figure 34 Caractérisation de ACP_{Mm} et ACP_{Hs}. (a-b) Gel SDS-PAGE 10 % après chromatographie d'affinité de ACP_{Mm} (a) ou ACP_{Hs} (b). (c-d) Spectre de spectroscopie de masse native de ACP_{Mm} (c) ou ACP_{Hs} (d). Les points rouges représentent la chaîne acyle.

Préparation des protéines et des complexes

Masses attendues

protéine	Masse (Da)	protéine	Masse (Da)	protéine	Masse (Da)
ACP _{Ec}	8 640	ACP _{Mm}	10 095	ACP _{Hs}	10169
ACP _{Ec} + PPT	8 981	6His-ACP _{Mm}	12 258	6His-ACP _{Hs}	12 332
ACP _{Ec} + PPT	8 981	6His- ACP _{Mm} + PPT	12 599	6His-ACP _{Hs} + PPT	12 673
ACP _{Ec} + PPT + C12	9 163	6His-ACP _{Mm} + PPT + C12	12 781	6His-ACP _{Hs} + PPT + C12	12 855

Tableau 3 Tableau récapitulatif des masses attendues pour ACP_{Ec}, ACP_{Mm} et ACP_{Hs}.

Masses expérimentales

Masses (Da)		attribution	Masses (Da)		attribution
ACP _{Mm}	ACP _{Mm} + DTT		ACP _{Hs}	ACP _{Hs} + DTT	
	12598	6His-ACP-PPT	12672	12672	6His-ACP-PPT
	12776	6His-ACP-PPT-C12	12850	12850	6His-ACP-PPT-C12
25194		(6His-ACP-PPT) ₂	25343		(6His-ACP-PPT) ₂
25372		(6His-ACP-PPT)- (6His-ACP-PPT-C12)	25522		(6His-ACP-PPT)- (6His-ACP-PPT-C12)
25552		(6His-ACP-PPT-C12) ₂	25700		(6His-ACP-PPT-C12) ₂

Tableau 4 Tableau récapitulatif des masses expérimentales obtenues par spectrométrie de masse native.

Nous avons également tenté de purifier les protéines NFS1 souris et humaine sans leurs partenaires ISD11 et ACP. Après élution de la colonne d'affinité au nickel, la protéine de souris est particulièrement peu soluble mais nous avons réussi à obtenir la forme humaine qui s'est avérée être un peu plus soluble. Néanmoins, cette protéine ne peut pas être concentrée par ultrafiltration due à une forte précipitation. Nous avons alors concentré la protéine par précipitation au sulfate d'ammonium mais la protéine ne peut pas être concentrée à plus de 50 μ M. Après la colonne de nickel la protéine étant déjà

Préparation des protéines et des complexes

pure à plus de 90 %, nous n'avons donc pas réalisé la seconde étape par chromatographie d'exclusion de taille. Le rendement de purification est faible en raison de sa très faible solubilité.

1.2 Purification de la protéine échafaudage ISCU

La purification de la protéine échafaudage ISCU se déroule de la même manière que la purification précédente. Après la surexpression de ISCU dans 6 L de cultures LB, les bactéries sont lysées puis centrifugées et le surnageant est chargé sur une colonne de nickel. Le chromatogramme d'élution montre la présence de deux pics à 280 nm, à 25 mL et 50 mL (**Figure 35a**). L'analyse par SDS-PAGE montre la présence d'une protéine de 15 kDa correspondant à ISCU uniquement dans le second pic (zone rose claire) (**Figure 35b**). L'étiquette 6xHis d'ISCU est clivée par la thrombine afin d'éviter toutes interactions non spécifiques avec les métaux dans nos expériences biochimiques.

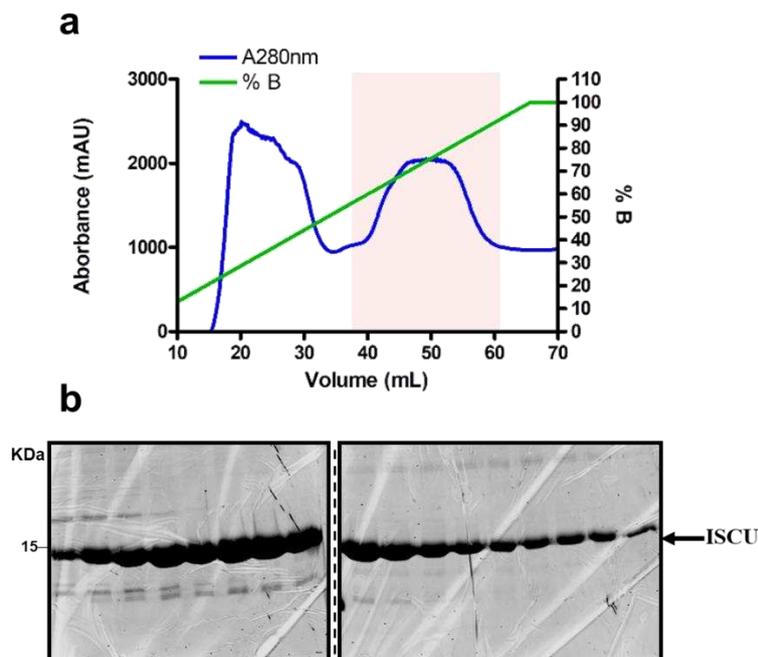


Figure 35 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel d'ISCU. **(a)** Chromatogramme de purification suivi par l'absorbance à 280 nm (courbe bleue). Le pourcentage de tampon d'élution B est représenté en vert. La zone rose claire correspond aux fractions contenant la protéine ISCU. **(b)** Gel SDS-PAGE 14 % des fractions correspondant à la zone rose claire du chromatogramme.

Nous avons réalisé des mesures de zinc dans ISCU par dosage colorimétrique avec du PAR et par ICP-MS. Nous avons trouvé 0,8 à 0,9 atome de zinc par ISCU (**#article2**). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant pour pouvoir insérer du fer dans ISCU, la protéine est démétallée par incubation avec 150 équivalents de DTPA durant 1 heure ainsi que 50 équivalents de DTT pour maintenir les résidus cystéines d'ISCU sous forme réduite. L'apoprotéine ISCU, apo-ISCU (c'est-à-dire sans métal),

Préparation des protéines et des complexes

est ensuite repurifiée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex™ 75 prep grade afin d'éliminer le DTPA. Le chromatogramme montre la présence de deux pics d'absorption à 280 nm à 46 et 70 mL correspondant respectivement à des formes oligomérique et monomérique d'apo-ISCU (**Figure 36**). La forme oligomérique n'étant pas active comme nous le verrons dans la suite du manuscrit, c'est la forme monomérique qui est récupérée et conservée. L'analyse par SDS-PAGE après concentration montre que la forme monomérique est pure à plus de 95 % (**Figure 36**). Le rendement de purification est de l'ordre de 5 à 10 mg de protéines par litre de culture. Les purifications des mutants d'ISCU *Mm* (C104S, H103A, M106I) ont été réalisées de manière similaire. De même les protéines IscU d'*E. coli* fournies par notre collaborateur (Rafal Dutkiewicz, Université de Gdansk, Pologne) sont préparées sous formes apo protéines selon ce protocole.

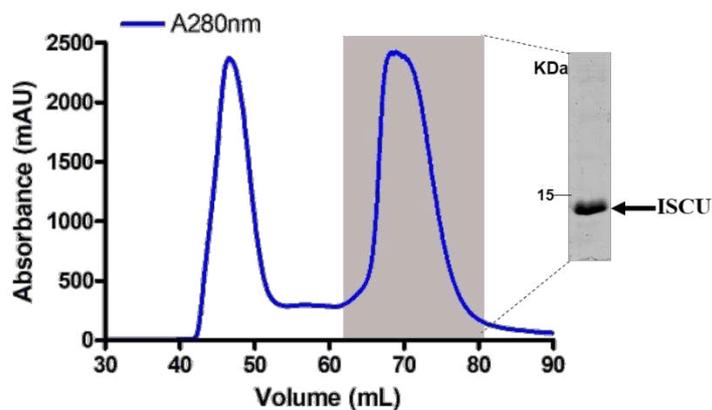


Figure 36 Chromatographie d'exclusion de taille d'ISCU. Chromatogramme de purification suivie à une absorbance de 280 nm. La zone rose claire correspond à la forme monomérique d'ISCU. Le gel SDS-PAGE 14 % correspond aux fractions réunies de la forme monomérique.

1.3 Purification de la frataxine

La frataxine étant extrêmement bien exprimée et soluble, un seul litre de culture LB est nécessaire pour obtenir suffisamment de protéine. Comme précédemment, après la lyse bactérienne et une centrifugation, le surnageant est chargé sur une colonne de nickel. Le chromatogramme d'éluion montre deux pics d'absorbance à 280 nm se chevauchant entre 22 et 45 mL (**Figure 37a**). L'analyse par SDS-PAGE montre que la frataxine est présente dans le second pic à une taille proche de 15 kDa cohérente avec la taille de la protéine (**Figure 37b**). À ce stade, la protéine est déjà très pure avec très peu de contaminants.

Préparation des protéines et des complexes

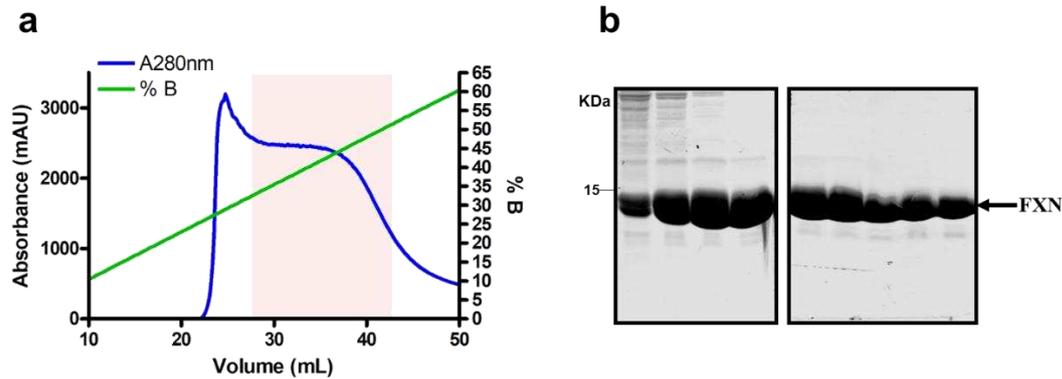


Figure 37 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la FXN. (a) Chromatogramme de purification suivie par l'absorbance à 280 nm (courbe bleue). Le pourcentage de tampon d'éluion B est représenté en vert. La zone rose claire correspond aux fractions contenant la frataxine. (b) Gel SDS-PAGE 14 % des fractions correspondant à la zone rose claire du chromatogramme.

L'étiquette 6xHis est ensuite clivée par la thrombine, puis la protéine est chargée sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille HiLoad 16/60 Superdex™ 75 prep grade. Le chromatogramme montre la présence de deux pics très intenses à 82 mL et 85 mL mais compatibles uniquement avec des formes monomériques (Figure 38). L'analyse par SDS-PAGE des fractions des deux pics regroupées montre une seule bande, à la taille attendue, avec une protéine pure à plus de 95 % (Figure 38). Les deux pics pourraient donc correspondre à deux conformations différentes de la protéine. Le rendement de purification après 1 L de culture LB est de l'ordre de 40 mg de protéines. Nous avons analysé la teneur en métaux de la protéine par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS). Les dosages de fer et de zinc ont montré que la protéine est dépourvue de ces deux métaux.

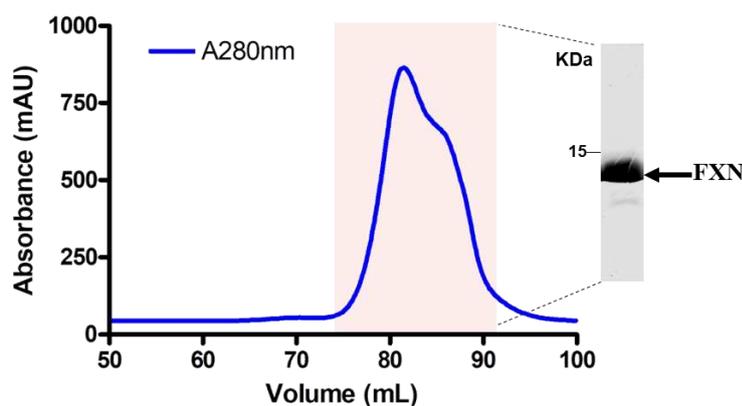


Figure 38 Chromatographie d'exclusion de taille de la FXN. Chromatogramme de purification suivie à une absorbance de 280 nm. La zone rose claire correspond à la forme monomérique de la frataxine. Le gel SDS-PAGE 14 % correspond aux fractions réunies de la forme monomérique.

Préparation des protéines et des complexes

1.4 Purification de la ferrédoxine

La ferrédoxine FDX2 a été purifiée de la même manière que les autres protéines, en deux étapes. FDX2 est une protéine contenant un centre [2Fe2S] stable lui procurant une couleur marron, ce qui facilite la purification. Après la surexpression de FDX2 dans 3 L de culture LB, les bactéries sont lysées et le lysat bactérien centrifugé. Le surnageant marron est par la suite chargé sur la colonne de nickel. Le chromatogramme montre la présence d'un pic d'absorbance à 280 nm et 420 nm très large centré vers 15 mL (**Figure 39a**). L'absorbance à 420 nm superposé au pic d'absorbance à 280 nm confirme bien la présence d'un centre Fe-S. L'analyse par SDS-PAGE des fractions confirme la présence d'une protéine de taille comprise entre 15 et 25 kDa, cohérente avec la taille de FDX2 qui est d'environ 20 kDa (**Figure 39b**).

L'étiquette 6xHis est ensuite clivée par la thrombine et l'extrait protéique est chargé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille HiLoad 16/60 Superdex™ 75 prep grade. Le chromatogramme montre la présence de deux pics d'absorbance minoritaires à 280 nm à 45 et 58 mL correspondant à des contaminants, et un pic d'absorbance intense à 280 et 420 nm à 68 mL confirmant la présence de FDX2 monomérique (**Figure 40a**). Les fractions présentent une couleur marron et l'analyse de toutes les fractions réunies montre que FDX2 est pure à plus de 95 % (**Figure 40a**). Le rendement de purification est de l'ordre de 15 mg de protéines par litre de culture. Le spectre UV-visible de la ferrédoxine purifiée montre des pics d'absorbance à 340, 412, 458 et 550 nm caractéristique de son centre [2Fe2S] (**Figure 40b**).

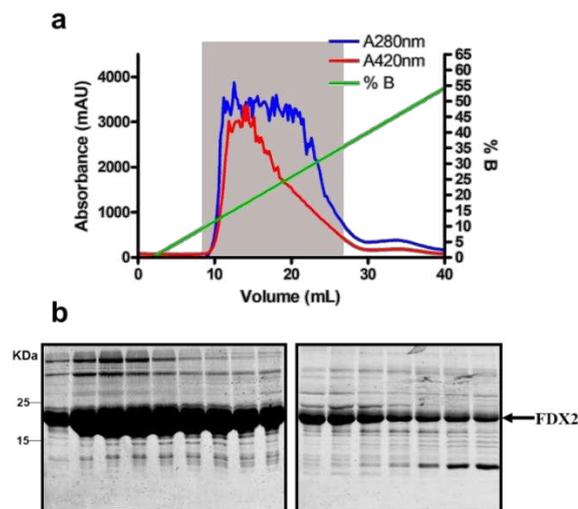


Figure 39 Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de FDX2. (a) Chromatogramme de purification suivie par l'absorbance à 280 nm (courbe bleue) et 420 nm (courbe rouge). Le pourcentage de tampon d'éluion B est représenté en vert. La zone rose claire correspond aux fractions contenant la ferrédoxine. (b) Gel SDS-PAGE 14 % des fractions correspondant à la zone rose claire du chromatogramme.

Préparation des protéines et des complexes

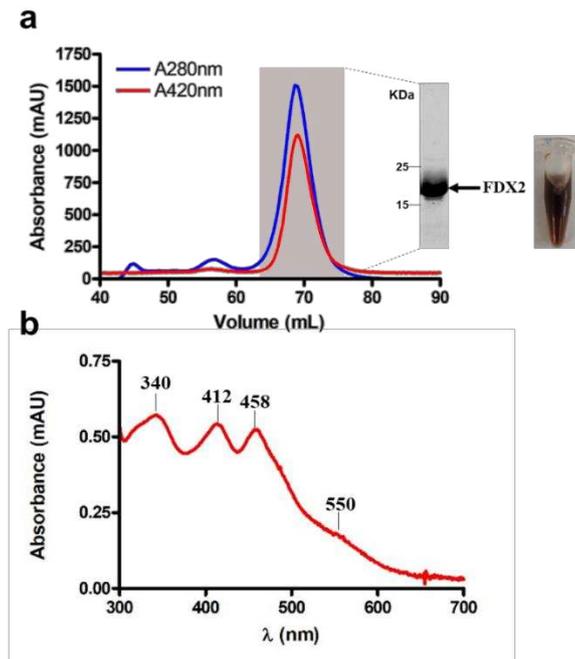


Figure 40 Chromatographie d'exclusion de taille de FDX2. (a) Chromatogramme de purification suivie à une absorbance de 280 nm (courbe bleue) et 420 nm (courbe rouge). La zone rose claire correspond à la forme monomérique de la ferrédoxine. Le gel SDS-PAGE 14 % correspond aux fractions réunies de la ferrédoxine. (b) Spectre UV-visible de la ferrédoxine purifiée.

2. Méthode d'alkylation ARBS

Les persulfures RSSH sont des modifications des résidus cystéines correspondant à la présence d'un atome de soufre supplémentaire (+32 Da). La détection et la quantification des persulfures en biologie sont donc difficiles en raison de la trop faible différence de poids moléculaire entre une cystéine réduite et une cystéine persulfurée. Les persulfures absorbent à 340 nm mais uniquement sous forme déprotonée et avec un coefficient d'absorption d'environ $400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, donc relativement faible pour pouvoir les quantifier de manière précise dans des protéines. L'une des techniques les plus couramment utilisées pour détecter les persulfures est la spectrométrie de masse. Cette technique est très puissante pour détecter la présence de persulfures mais reste difficile à mettre en place en routine pour étudier des phénomènes cinétiques en raison de la quantité d'échantillons à analyser. Une autre technique qui a été très utilisée est le marquage avec du soufre ^{35}S qui est possible dans le cas des cystéines désulfurases. Mais cette technique ne permet pas de quantifier les persulfures car la forme non persulfurée n'est pas détectée. Un très grand nombre de techniques ont donc été développés pour suivre la formation et quantifier les persulfures *in vitro* et *in vivo* (Filipovic & al, 2018). Cependant, la plupart de ces techniques reposent sur un grand nombre d'étapes pour dériver les persulfures et à notre connaissance aucune d'entre elles n'est ratiométrique, ce qui est une condition essentielle pour pouvoir quantifier les persulfures de manière rigoureuse et réaliser des études cinétiques.

Préparation des protéines et des complexes

Le laboratoire a développé une méthode qui repose sur l'alkylation pour détecter et quantifier les persulfures par gel d'électrophorèse. Cette technique appelée ARBS (Alkylation-Reduction Band Shift) est basée sur le marquage de persulfures par des agents alkylants lourds afin de séparer les protéines persulfurées et non persulfurées par gel d'électrophorèse.

Les protéines sont marquées par un maléimide greffé à un substituant lourd qui réagit spécifiquement avec les groupements thiols et qui est suffisamment lourd pour pouvoir altérer la migration de manière visible sur gel d'électrophorèse (**Figure 41a**). A la première étape, les cystéines persulfurées et non persulfurées réagissent avec le maléimide ce qui conduit à la formation de liaisons succinimide-soufre avec le soufre du résidu cystéine et avec celui du soufre terminal du persulfure. Ce traitement permet également de stopper la réaction en cours, nous permettant ainsi de réaliser des études cinétiques. Un traitement par du β -mercaptoéthanol ou DTT va ensuite réduire la liaison soufre-soufre du persulfure relarguant ainsi le succinimide-soufre portant l'alkylant lourd. La perte de ce substituant lourd conduit à une perte de poids moléculaire qui devient visible sur gel d'électrophorèse permettant de discriminer et quantifier les protéines persulfurées (**Figure 41b**). La technique est décrite dans un article de méthode (**Article#1**).

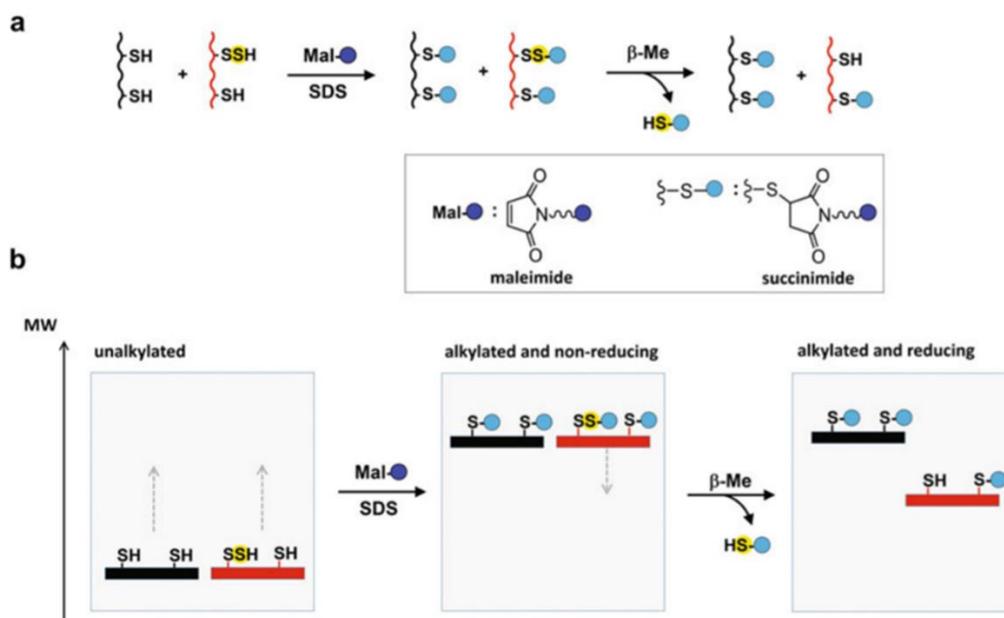


Figure 41 Principe de la méthode d'alkylation pour visualiser et quantifier les persulfures. (a) Les protéines sont incubées avec un agent alkylant lourd appelé maléimide (rond bleu foncé) afin d'alkyler tous les thiols présents. Cette alkylation conduit à la formation d'une liaison succinimide-soufre portant la maléimide (rond bleu clair). Après l'ajout d'un agent réducteur, les protéines portant un persulfure perdent le succinimide portant le maléimide. (b) Sans alkylation une protéine persulfurée (en rouge) et une protéine non persulfurée (en noir) ne peuvent pas être distinguées par gel d'électrophorèse due au faible poids moléculaire de cette modification (+32 Da). Lorsque les protéines sont alkylées, elles gagnent en poids moléculaire correspondant au nombre de cystéines alkylées. Après la réduction du persulfure par un agent réducteur le maléimide est relâché conduisant à une perte de poids moléculaire permettant de discriminer par gel d'électrophorèse une protéine persulfurée ou non. (Issue de Gervason & al, 2021)

Préparation des protéines et des complexes

3. ARTICLE#1 : A Fast and Ratiometric Method for Quantification of Cysteine-Bound Persulfides Based on Alkylation and Gel-Shift Assays

A Fast and Ratiometric Method for Quantification of Cysteine-Bound Persulfides Based on Alkylation and Gel-Shift Assays 2 3 4

Sylvain Gervason, Batoul Srour, and Benoit D'Autréaux 5

Abstract 6

Cysteine-bound persulfides (Cys-SSH) in proteins are sulfur carrier intermediates in the synthesis of essential cofactors such as iron-sulfur clusters, molybdenum cofactor, vitamin (thiamine), and thionucleosides (thiolated tRNA). Protein-bound persulfides are also used for signaling purposes as a carrier of the “H₂S” signal. Several methods have been developed to detect and quantify cysteine-bound persulfides in protein and monitor their exchange. The main challenge in developing these techniques is to discriminate persulfidated cysteine from cysteine and other cysteine modifications. It is also critical to develop ratiometric methods to quantify the level of persulfidation in the protein of interest. We describe here a ratiometric method to label and quantify protein-bound persulfides relying on alkylation and gel-shift assays. This method is based on the derivation of cysteine and persulfides with “heavy” alkylating agents, followed by specific cleavage of the sulfur-sulfur bond of the alkylated persulfide by a reducing agent and separation of the alkylated species by electrophoresis. A persulfide is thus revealed by the appearance of a species lacking one alkylation unit under reducing conditions. We call this alkylation-reduction band-shift (ARBS) assay. Moreover, the quantification of the bands corresponding to the persulfidated and non-persulfidated species in the same lane provides a ratiometric quantification allowing determination of the level of persulfidation of individual cysteine. Other cysteine modifications such as disulfides, sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiols, and sulfenamides preclude alkylation. Thus, they may appear as false positives, but they are ruled out by the analysis under nonreducing conditions since these species do not behave as persulfides under these conditions. 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Keywords Persulfide, Sulfane, Sulfur, Alkylation, Maleimide, Ratiometric, Iron-sulfur cluster, Thio-nucleosides, Molybdenum cofactor, Persulfidation, Sulfhydration, H₂S, Signaling, Band-shift, Cysteines modifications, Disulfides, Sulfenic, Sulfinic, Sulfonic acids, Nitrosothiols, Sulfenamide 25
26
27

1 Introduction 28

A growing interest in persulfide biology has emerged with the discovery that they function as sulfur carrier intermediates in the synthesis of iron-sulfur clusters, thionucleosides, molybdenum cofactor, and thiamine [1, 2]. In the last decades, a growing interest in the study of persulfides has emerged with the discovery that 29 AU1
30
31
32
33

protein-bound persulfides are also used for signaling purposes as a carrier of the “H₂S” signal. [3–5] In proteins, persulfides are formed with the thiol moiety of cysteine residues (Cys-SSH). They belong to a particular type of disulfides in which one sulfur is not linked to a carbon but to a hydrogen as in thiols. The generic formula of persulfides is R(R')(R'')CSSH, where R, R', and R'' are any type of substituents, and the terminal sulfur (the sulfhydryl) is called sulfane sulfur. As for disulfides, the sulfur–sulfur bond of persulfides reacts with thiols, which allows the exchange of sulfur atoms between cysteine residues via trans-persulfidation reactions [3].

Several methods have been developed to detect and quantify persulfidated cysteines in proteins, both in cell and in vitro [3–5]. Mass spectrometry is one of the most powerful techniques to detect these species but is not suitable for routine and in vivo studies [6, 7]. Radioactive labeling by ³⁵S has been successfully used, but is not a ratiometric method allowing quantitative detection and presents hazard issues [8–11]. Since the modification induced by persulfidation is too small (+32 Da) to be detected by conventional electrophoresis techniques and its absorption coefficient (~400 M⁻¹ cm⁻¹ at 340 nm) is too low for sensitive detection by electronic absorption spectroscopy [12–14], most detection techniques rely on the derivation of persulfides. The major challenge in developing these techniques is to discriminate a persulfide from a cysteine thiol since both are nucleophiles. It is also challenging to discriminate this modification from other modified forms of cysteine, such as disulfide bonds, sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiols, and sulfenamides. Another issue is to obtain ratiometric quantification that is essential to measure the level of persulfidation of a particular cysteine residue. A ratiometric method entails that both the persulfidated and non-persulfidated forms are quantified simultaneously to afford the most accurate results. The last challenge is to determine the number of persulfidated cysteines, which requires either a determination of the total number of persulfides per protein or the separation and the identification of each persulfidated form. Finally, a protocol with a limited number of steps warrants better reproducibility and facilitates routine studies. Our laboratory has developed the alkylation-reduction band-shift (ARBS) assay, which is a specific, ratiometric, and rapid technique to quantify protein persulfides and perform kinetic studies routinely [7].

1.1 Principle of the ARBS Assay

This assay is based on redox-sensitive labeling of persulfides using “heavy” alkylating agents to allow separation of each persulfidated species by gel electrophoresis. The terminology “heavy” is used here to describe an alkylating agent carrying a substituent sufficiently heavy to increase the molecular weight of the protein and enables separation of poly-alkylated species of different sizes. The labeling part relies on two successive reactions (Fig. 1a). First, the

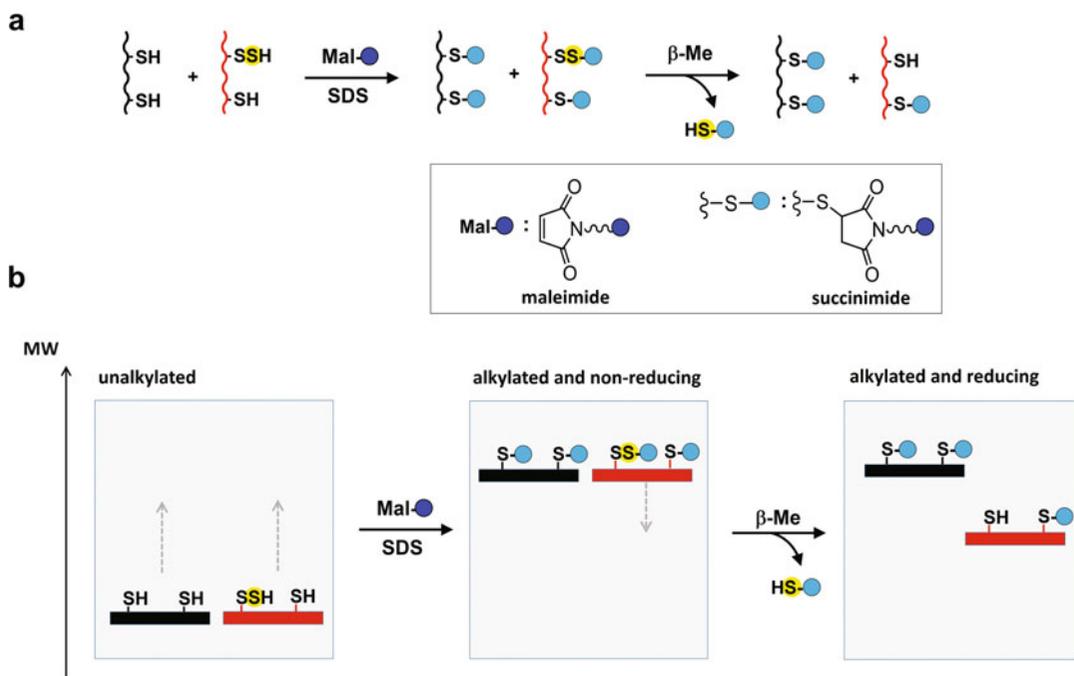


Fig. 1 Alkylation assay principle. **(a)** Scheme of the ARBS assay. The proteins are first reacted with a heavy alkylating agent, a maleimide bound to a heavy substituent (deep blue balls) under denaturing conditions (SDS). The alkylating agent reacts with all sulfhydryl (cysteine residues, persulfide, and free L-cysteine) leading to formation of a succinimide-sulfur link carrying the heavy substituent (light blue balls). In a second step, the reaction mixture is reduced by β -mercaptoethanol. **(b)** Expected migration profiles on SDS-PAGE at each step of the ARBS assay. An example is provided for a protein containing two cysteine residues, and that is partially persulfidated on one of them. Before alkylation (**unalkylated**), the persulfidated (red bar) and non-persulfidated (black bar) protein co-migrate at the expected size of the protein. Upon alkylation, both cysteines and persulfidated cysteines are alkylated by the heavy maleimide, which increases the size of the protein by two alkylation unit. Under these conditions (**alkylated and nonreducing**), the persulfidated and non-persulfidated alkylated protein still co-migrate. Upon reduction of the S-S bond of the alkylated persulfide by β -mercaptoethanol, a sulfur-succinimide-substituent moiety is lost, which decreases the size of the protein by one alkylation unit (**alkylated and reducing**). Then, the bands corresponding to the persulfidated and non-persulfidated alkylated proteins are quantified by light densitometry in the same well, which provides a ratiometric measurement of the persulfidation level

protein mixture is incubated under denaturing conditions with a 82
 maleimide compound, which is a thiol-specific alkylating agent (*see* 83
Note 1). This reaction leads to the alkylation of both cysteine and 84
 cysteine-bound persulfides in the form of sulfur-bound succinimide 85
 group linked to the sulfur of cysteines and the sulfane sulfur of 86
 persulfides. To differentiate cysteine and persulfides, the sulfur- 87
 sulfur bond of the persulfide is cleaved by a reducing agent such as 88
 β -mercaptoethanol (*see* **Note 2**), which leads to the release of the 89
 sulfur-succinimide moiety with its substituent. As reducing agents 90
 are not able to cleave the sulfur-carbon bond within the sulfur- 91
 succinimide attached to cysteine residues, the release of a sulfur- 92

succinimide-substituent moiety is specific to the presence of a persulfide. Then, the reaction mixture is analyzed by electrophoresis on gel (SDS-PAGE) to separate the alkylated forms of the proteins (Fig. 1b). The substituent linked to the maleimide must be sufficiently heavy to allow visualization of its loss by SDS-PAGE.

Moreover, the mass loss is directly related to the number of persulfides in the protein by counting the number of mass-unit lost using a ladder of partially alkylated species (*see* Subheading 3.1 for its generation). Then, the bands corresponding to the fully alkylated protein (non-persulfidated) and partially alkylated species (persulfidated species) are quantified by light densitometry, which provides the level of persulfidation of a cysteine residue. We call this persulfide quantification assay ARBS assay.

1.2 Ruling out Other Cysteine Modifications

Several other cysteine modifications produce effects akin to persulfidation in the persulfide detection assay (Fig. 2). Two kinds of modifications must be considered: those involving one cysteine residue (1-Cys) such as inter-protein disulfides, sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiols, and sulfenamides and the modifications involving two cysteine residues on the same protein (2-Cys), the only representative being intramolecular disulfide bonds (*see* Note 3). As both 1-Cys and 2-Cys modifications preclude full alkylation at the first step, they will appear as partially alkylated species, which could constitute false positives for persulfides. However, the analysis of the reaction before reduction will discard false positives since all these modifications have very specific behaviors under nonreducing conditions.

1.2.1 Characterization of 1-Cys Modifications

Among 1-Cys modifications, sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiols, and sulfenamides produce distinct features on gels compared to inter-protein disulfides (Fig. 2). Under nonreducing conditions, inter-protein disulfides appear as high molecular weight complexes between the protein of interest (Fig. 2, **pink species**) and another protein or the same protein in the case of a homodimer (Fig. 2, **orange species**), while protein carrying sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiol, or sulfenamide remain monomeric under both reducing and nonreducing conditions (Fig. 2, **green species**). Upon reduction, the intermolecular disulfide bond will be cleaved to yield a species missing one alkylation mass-unit that could be confounded with a persulfide (Fig. 2, compare pink and red species). But the presence of a complex of high molecular weight under nonreducing conditions that disappears upon reduction will provide a proof that this is a false positive. Similarly, proteins carrying 1-Cys modifications will appear as species missing one or more alkylation units under reducing conditions, which again could be confounded with persulfides (Fig. 2, compare green and red species). However, under nonreducing conditions, these species will already appear as partially alkylated while a

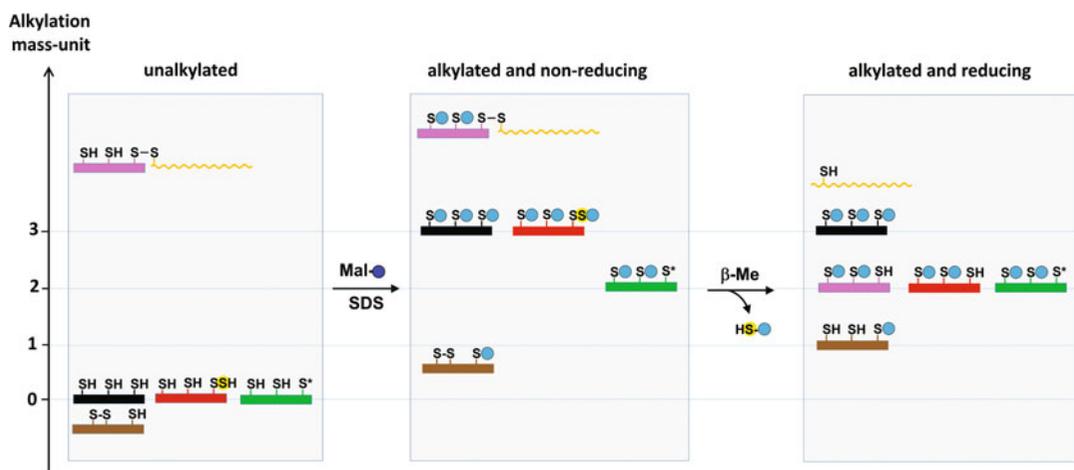


Fig. 2 Expected migration profiles for other cysteine modifications in the ARBS assay. The migration profiles in the ARBS assay for the most common cysteine modifications is presented with a protein containing 3 cysteine residues either not modified (black species), modified on one of cysteine residue by persulfidation (red species), or by the formation of a sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, a nitrosothiol, or a sulfenamide (green species with an asterisk on S to indicate the modification) or by the formation of an intermolecular disulfide bond (pink species linked to orange species) and modified on two cysteines by the formation of an intramolecular disulfide bond (brown species). The migration profiles are analyzed before alkylation (**unalkylated**) and after alkylation by a maleimide derivative (**alkylated**), under nonreducing (**alkylated and non-reducing**) and reducing (**alkylated and reducing**) conditions. Under reducing conditions, 1-Cys modified proteins (pink and green species) co-migrate with persulfidated proteins on 1 cysteine (red species), and 2-Cys modified proteins (brown species) co-migrate with proteins persulfidated on 2 cysteines (not represented), which constitute false positives. Under nonreducing conditions, 1-Cys and 2-Cys modified proteins do not co-migrate with the persulfidated protein (red species), which identifies them as false positives

persulfidated protein is fully alkylated. Thereby, again, the analysis 141
of nonreducing conditions will provide a means to discard these 142
false positives. 143

1.2.2 Characterization of 2-Cys Modifications

Proteins oxidized in the form of an intramolecular disulfide, which 145
is the only representative of 2-Cys modifications, contains two 146
unreactive cysteines toward alkylating agents. These species will 147
be lacking two alkylation unit under reducing conditions and thus 148
could be confounded with the presence of two persulfides (Fig. 2 149
brown species). However, as for 1-Cys modification, the analysis 150
under nonreducing conditions will reveal that this species is not 151
fully alkylated, while a persulfide will be. In addition, the presence 152
of a disulfide can alter protein migration, especially if the disulfide 153
involves distant cysteines. Upon reduction of the disulfide, its 154
migration will be further affected, which could provide another 155
way to pinpoint the presence of intramolecular disulfides. 156

1.3 Choice of Alkylating Agents

Heavy maleimides are created by linking a substituent to the nitro- 158
gen atom of the heterocycle ring of the maleimide moiety (Fig. 3). 159

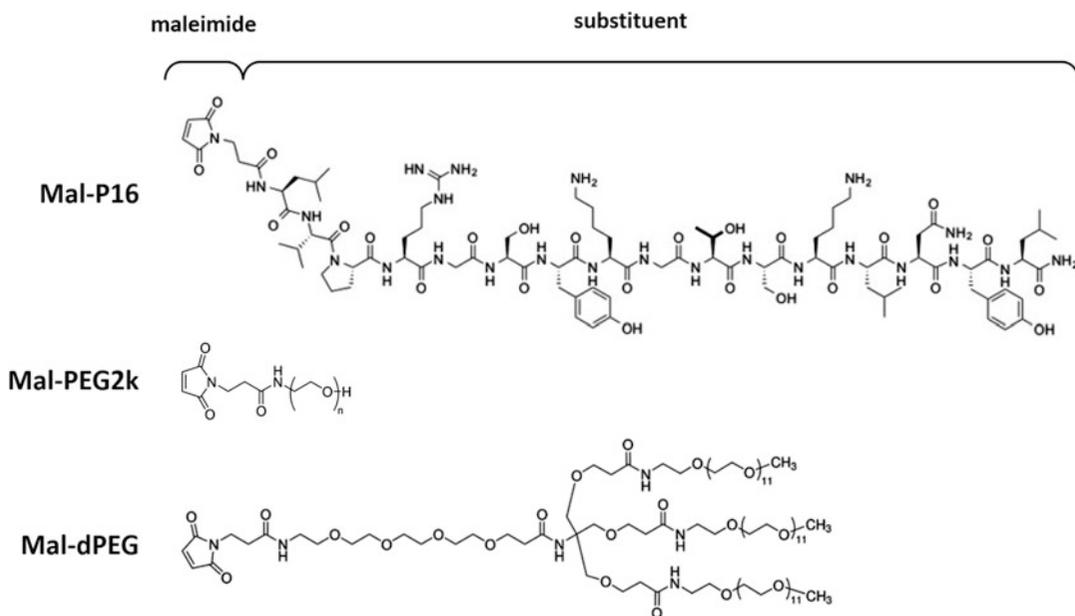


Fig. 3 Structure of selected “heavy” maleimide derivatives. Heavy maleimide derivatives are generated by connecting a heavy substituent to the nitrogen atom of the heterocycle ring of the maleimide moiety. Here, the structures of “heavy” maleimide derivatives are presented with three different substituents: a 16-mer peptide (Mal-P16, MW = 1.95 kDa), a PEG polymer of mean size of 2 kDa (Mal-PEG2k, MW ≈ 2 kDa), and a branched chained poly-PEG substituent (Mal-dPEG, MW = 2.36 kDa)

AU3

Three maleimide derivatives with different substituents are depicted here (Fig. 3). A maleimide fused to a homemade 16-mer peptide (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Tyr-Lys-Gly-Thr-Ser-Lys-Leu-Asn-Tyr-Leu), resulting in a 1.95 kDa compound named Mal-P16, and two commercially available compounds, one with a polyethylene glycol (PEG) polymer tail of mean size of 2 kDa (Mal-PEG2k) and another one with a branched chained poly-PEG substituent (Mal-dPEG₄-(m-dPEG₁₂)₃), resulting in a 2.36 kDa derivative named Mal-dPEG. The main goal in using a peptide (Mal-P16) instead of PEG derivatives (Mal-PEG, Mal-dPEG) is to ensure that migration in SDS-PAGE is not aberrant and directly correlated to the size of the substituent. However, the dPEG substituent provides reliable results too (Fig. 4a). The choice of the most suitable alkylating agent relies on two main criteria: (1) its ability to produce the thinnest bands, which is linked to the nature of the substituent; and (2) the resolution of the alkylation pattern, that is, the separation between each alkylated species, which is linked to the size of the protein of study, the number of cysteine residues, and the size of the maleimide derivative. This must be evaluated on a case-by-case basis by generating an alkylation profile prior to any assay.

160

161

162

163

164

165

166

167

168AU2

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

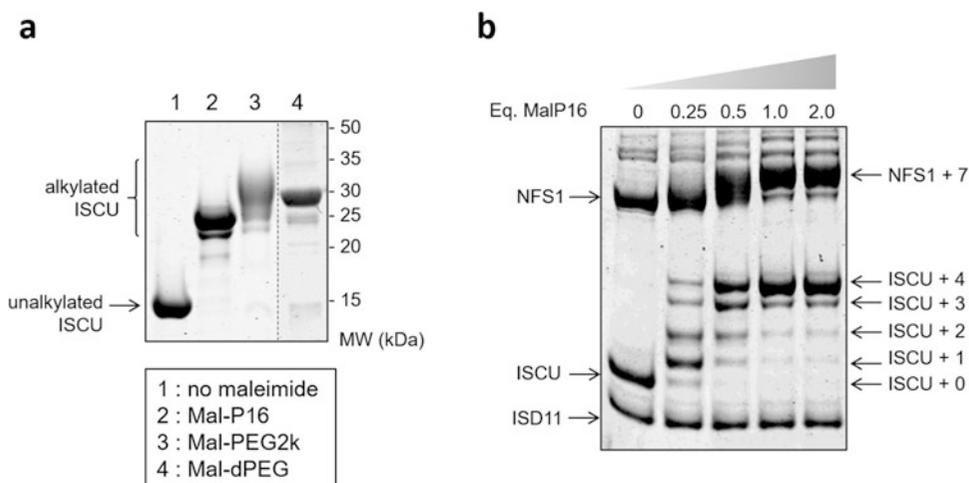


Fig. 4 Alkylation profiles. **(a)** Alkylation profiles of mouse ISCU with Mal-P16, Mal-PEG2k, and Mal-dPEG. The reactions were performed by adding 2 μ L of the alkylating reagent solution at 4.0 mM to 50 μ L of the ISCU protein at 20 μ M, which corresponds to 2 molar equivalents relative to the total number of cysteines since ISCU contains four cysteine residues. The Mal-PEG2k shows very fuzzy bands due to its heterogeneity, while Mal-P16 and Mal-dPEG display much thinner bands (*see Note 8*). The estimated molecular weight of the main alkylated species with Mal-P16 and Mal-dPEG are 25 kDa and 28 kDa, respectively, thus very close to those expected for the alkylation of all four cysteine residues of ISCU at 23.5 kDa and 25 kDa, which indicates that the most intense bands correspond to fully alkylated ISCU. **(b)** Titration of the cysteines in the mouse NIAU complex by Mal-P16. NFS1 contains seven cysteines, ISD11 no cysteine and the cysteine residue of ACP is not available. Thus, a total of 11 reactive thiols are present in the NIAU complex. The reactions were performed by adding 0, 1, 2, 4, and 8 μ L of the 2.75 mM maleimide reagent solution (Mal-P16/SDS) to 50 μ L of the 20 μ M NIAU complex, which corresponds to 0.25, 0.5, 1, and 2 molar equivalents of Mal-P16 versus total thiols. The alkylated species are denoted ISCU + n and NFS1 + n, where n is the number of alkylated cysteines. The reaction performed with sub-stoichiometric amounts of Mal-P16 (0.25 equivalents) shows five bands that were attributed to unalkylated ISCU (ISCU+0) and ISCU alkylated on one (ISCU+1), two (ISCU+2), three (ISCU+3), and four (ISCU+4) cysteine residues. The titrations show that 1 molar equivalent is sufficient to fully alkylate both ISCU and NFS1, which corresponds to the minimum required, thus indicating that the reaction is efficient

2 Materials

182

1. Phosphate buffer: 50 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 8. 183 184
2. Protein sample: purified protein prepared in phosphate buffer (*see Note 4*). 185 186
3. Mal-P16 (synthesized at the laboratory⁷), Mal-PEG2k (Sigma), Mal-dPEG (Sigma) stock solutions: 5 mM solution prepared in deionized water and stored at -20°C . 187 188 189
4. Maleimide reagent solution: alkylating agent at the desired concentration, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) freshly prepared in deionized water from stock solutions of the alkylating agent. 190 191 192 193

5. TCA: 20% trichloroacetic acid prepared in water and stored at 4 °C. 194
195
6. Resuspension buffer: 50 mM sodium phosphate, 8 M urea, 150 mM NaCl, pH 8. 196
197
7. 5× nonreducing gel-loading buffer: 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol. 198
199
8. 5× reducing gel loading buffer: 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol, 0.5 mM β-mercaptoethanol. 200
201
202
9. SDS-PAGE: 14% and 10% polyacrylamide gels, 0.1% SDS. Gels are prepared following standard procedures with acrylamide: bis-acrylamide ratio of 19:1. 203
204
205
10. Gel imager: Gel imager for band quantification such as Odyssey scanner (Li-Cor) (*see Note 5*). 206
207
11. Coomassie staining solution: 1 g/L Coomassie blue R 250, 45% ethanol, 45% water, 10% glacial acetic acid. 208
209
12. Coomassie destaining solution: 80% water, 10% ethanol, 10% glacial acetic acid. 210
211
13. L-Cysteine solution: 10 mM L-cysteine prepared in deionized water. 212
213

3 Methods 214

All the assays presented here were developed with the mouse iron-sulfur cluster assembly machinery, which encompasses NFS1-ISD11-ACP (NIA), a cysteine desulfurase complex that generates persulfide on NFS1 by desulfurization of L-cysteine and transfers its persulfide to ISCU within the NFS1-ISD11-ACP-ISCU (NIAU) complex, in a reaction stimulated by frataxin (FXN) in the NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN (NIAUF) complex [7, 15]. Nevertheless, these methodologies can be adapted to the study of any other proteins involved in persulfide formation and transfer. 215
216
217
218
219
220
221
222
223

3.1 Generation of Alkylation Profiles 224

The protocols described below are used to probe the alkylation profile of the protein of interest (Fig. 4). These experiments help to choose the most suitable alkylating agent, assess its efficiency, and provide a ladder of the alkylated species that will be used in the persulfidation assays to count the number of persulfidated cysteines. The protocol is presented here for the ISCU protein and the NIAU complex, but can be applied to any other proteins. 224
225
226
227
228
229
230
231

3.1.1 Selection of Alkylating Agents 232

1. Reduce the protein of interest with 10 molar equivalents of DTT for 30 min at room temperature, then desalt the protein on a Sephadex G25 column equilibrated with phosphate buffer. 232
233
234
235

2. Initiate the reaction by mixing 50 μL of the protein at a final concentration of 20 μM with a twofold excess of the maleimide reagent regarding the total number of cysteines (*see Note 6*) and incubate the reaction for 30 min at room temperature. 236
237
238
239
 3. Add 5 μL of reducing loading buffer to 20 μL of the reaction mixture and incubate for 30 min at room temperature. 240
241
 4. Load a volume containing 200 pmoles of the protein solution onto 14% acrylamide gel (*see Notes 4 and 7*). Run the gel for 2 h at 90 V, stain the gel with Coomassie blue solution, and destain. Scan the gel with an imager. 242
243
244
245
 5. Analyze the results (Fig. 4a). Compare the alkylation profiles obtained with the maleimide derivatives and select the alkylating agent generating the thinnest bands (*see Note 8*). Check that the size of the alkylated species on the gel is consistent with the expected size according to the total number of cysteines; otherwise, it means that some of the cysteine residues of the protein are oxidized (*see Subheading 1.2*). In this case, repeat **step 1** with higher DTT concentrations to try to get rid of reversible oxidations. 246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
- 3.1.2 Generation of a Ladder and Assessment of the Efficiency of the Alkylating Agent
1. Reduce the protein of interest with 10 molar equivalents of DTT for 30 min at room temperature, then desalt the protein on a Sephadex G25 column equilibrated with phosphate buffer. 256
257
258
259
 2. Initiate the reaction by mixing 50 μL of the protein of interest at 20 μM with 0.25, 0.5, 1, and 2-molar equivalents of the maleimide reagent regarding the total number of thiols (*see Note 6*). Incubate the reaction for 30 min at room temperature. 260
261
262
263
264
 3. Add 5 μL of loading buffer to 20 μL of the reaction mixture and incubate for 30 min at room temperature. 265
266
 4. Load 200 pmoles of the protein solution onto 14% acrylamide gel (*see Notes 4 and 7*). Run the gel for 2 h at 90 V and stain/destain with Coomassie blue solution. Scan the gel with an imager. 267
268
269
270
 5. Analyze the results (Fig. 4b). First, count the number of bands corresponding to the alkylated species in the reactions performed with sub-stoichiometric amounts of the alkylating agent. The number of bands is expected to be equals to the total number of cysteines with an additional band corresponding to the unalkylated species. In any other cases, a cysteine is probably oxidized (*see Subheading 1.2*). In this case, repeat **step 1** with higher DTT concentrations to try to get rid of reversible oxidations. Note the position of each alkylated species, which will be used to determine the number of persulfidated cysteines (*see Subheading 3.2*). Check how many 271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281

	equivalents of the alkylating agent are required to saturate all	282
	the thiols, which should be close to the stoichiometry regard-	283
	ing the total number of thiols in the solution (<i>see Note 9</i>).	284
	Assess the resolution of the alkylation procedure: the bands	285
	corresponding to partially alkylated species must not overlap.	286
	Otherwise, use an alkylating agent of higher molecular weight.	287
		288
3.2 Detection and	Two protocols are presented here, one for persulfide detection and	289
Quantification of	quantification and another for the kinetics of trans-persulfidation	290
Persulfides,	reactions. The reactions are analyzed under reducing and nonre-	291
Monitoring the Kinetic	ducing conditions to discriminate persulfides and false positives (<i>see</i>	292
of Persulfide Transfer	Subheading 1.2). The mouse NIA complex in which a persulfide is	293
	formed by NFS1 and the mouse NIAU and NIAUF complexes in	294
	which the persulfide is transferred to ISCU are used to illustrate the	295
	assays, but the protocols apply to any other proteins [7, 15].	296
		297
3.2.1 Persulfide	1. Reduce the proteins and the complexes with 10 molar equiva-	298
Detection and	lents of DTT prior to any reaction and desalt them on a	299
Quantification	Sephadex G-25 column equilibrated with phosphate buffer.	300
	2. Prepare 100 μL of the cysteine desulfurase complexes (NIA and	301
	NIAUF) at 20 μM and split the reaction into two parts of	302
	50 μL . Add 2 μL of L-cysteine at 1 mM to one part, which	303
	corresponds to 2 molar equivalents of L-cysteine, and incubate	304
	the reaction at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min (<i>see Note 10</i>). Leave the other	305
	part without L-cysteine.	306
	3. Add twofold excess of the maleimide derivative solution	307
	regarding the total number of thiols (<i>see Note 6</i>) to 20 μL of	308
	each reaction mixture and incubate the reaction for 30 min at	309
	room temperature.	310
	4. Split each reaction into two parts of 10 μL and add 3 μL of	311
	loading buffer with β -mercaptoethanol to one part and 3 μL of	312
	loading buffer without β -mercaptoethanol to the other part.	313
	Incubate 30 min at room temperature.	314
	5. Load 50 pmoles of the NIA complex and 200 pmoles of the	315
	NIAUF complex onto 10% and 14% SDS-PAGE, respectively	316
	(<i>see Notes 4 and 7</i>).	317
	6. Run gels at 90 V, 2 h for a 14% gel, and 5 h for a 10% gel. Reveal	318
	the proteins by Coomassie staining/destaining. Scan the gels	319
	with an imager.	320
	7. Quantify individual bands using an imager (<i>see Note 5</i>).	321
	8. Analyze the results (Fig. 5a, b). Mass loss must be observed	322
	under reducing conditions only in the reaction performed with	323
	L-cysteine. Compare the position of the bands with the ladder	324
	to determine how many cysteines are persulfidated. No mass	325
	loss must be observed under nonreducing conditions; other-	326
	wise, it means that it is a false positive (Subheading 1.2). No	327

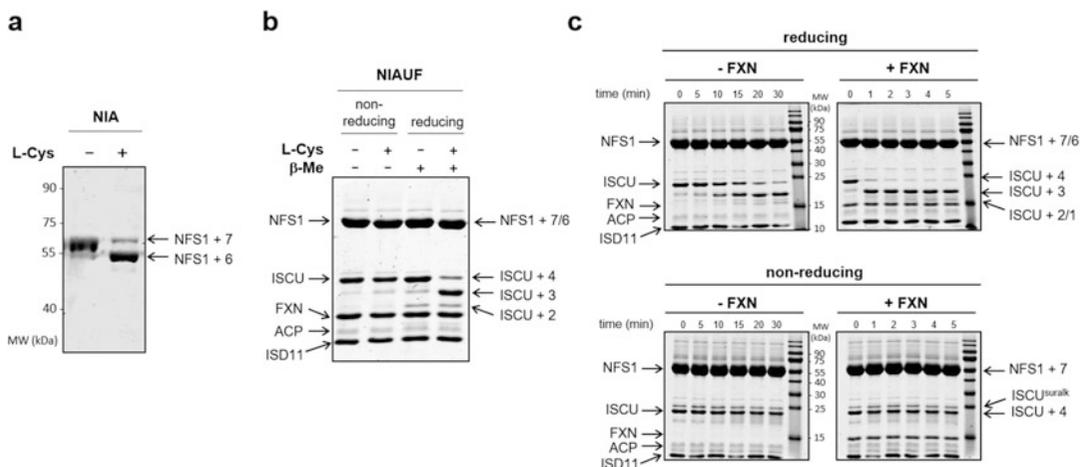


Fig. 5 ARBS assays for persulfide formation on NFS1 and transfer to ISCU. **(a and b)** ARBS assay on NFS1 in the NIA complex **(a)** and ISCU in the NIAUF complex **(b)** in the absence and presence of L-cysteine analyzed using Mal-dPEG **(a)** and Mal-P16 **(b)**. **(a)** The reaction is analyzed under reducing conditions. In the absence of L-cysteine, NFS1 is alkylated on all its cysteines (NFS1 + 7 species) and on 6 cysteines when L-cysteine is added (NFS1 + 6 species), which indicates formation of a persulfide. Resolution (spacing between NFS1 + 6 and NFS1 + 7) is satisfactory with Mal-dPEG. **(b)** The reaction is analyzed under reducing and nonreducing conditions. ISCU is alkylated on all its cysteine residues in the absence of L-cysteine (ISCU + 4 species) and loses one alkylation unit in the presence of L-cysteine (ISCU + 3 species), which indicates that a persulfide is transferred to ISCU (lane 3 and 4). ISCU keeps all its cysteine alkylated under nonreducing conditions both in the presence and in the absence of L-cysteine (lanes 1 and 2), which confirms that the loss of one alkylation unit is due to the reduction of a persulfide by β-mercaptoethanol. An ISCU + 2 species is present under reducing conditions but not under nonreducing conditions that could be attributed to either an oxidized cysteine or a second persulfidated cysteine. However, this band is also present in the absence of L-cysteine, thus ruling out the possibility of a second persulfide. It may thus correspond to an intramolecular disulfide (*see* Subheading 1.2). **(c)** ARBS assays for kinetics of persulfide transfer to ISCU in the NIAUF complex in the presence (+FXN) and absence (–FXN) using Mal-P16 and analyzed under reducing and nonreducing conditions. The gels show the progressive appearance of the ISCU + 3 species corresponding to persulfidated ISCU on a single cysteine (top panels). This transfer is accelerated in the presence of FXN. The analysis under nonreducing conditions (lower panels) shows mainly the ISCU + 4 species, which validates that the ISCU + 3 species corresponds to a persulfide. Under nonreducing conditions, an alkylated species with lower mobility than the ISCU + 4 appears. This species is attributed to over alkylated ISCU on a non-cysteine residue, probably nitrogen, since maleimides also react with nitrogen (*see* Note 4) and is denoted ISCU^{suralk}. The formation of this species is most likely due to the presence of Mal-P16 that is not quenched under nonreducing conditions

mass loss must neither be observed in the absence of L-cysteine 328
 since it is the substrate of the NIA complex to generate a 329
 persulfide; otherwise, it is a false positive (Subheading 1.2). 330

3.2.2 Monitoring the 332
 Kinetic of Persulfide 333
 Transfer by SDS Quenching 334

The same protocol as persulfide detection and quantification is used 332
 to assess the kinetics of persulfide formation or transfer, but in this 333
 case, a larger volume of the reaction mixture is prepared, and 334
 samples are withdrawn at desired times. The reaction is quenched 335

- by mixing with the alkylating agent in SDS. The alkylating agent blocks all available thiols while SDS rapidly denatures the proteins.
1. Reduce the proteins with 10 molar equivalents of DTT prior to any reaction and desalt them on a Sephadex G-25 column equilibrated with phosphate buffer.
 2. Prepare 150 μL of the protein solutions (NIAU, NIAUF) at a final concentration of 20 μM in phosphate buffer.
 3. Withdraw 20 μL of the protein mixture and mix it with a twofold excess of the maleimide derivative solution relative to the total number of thiols (*see Note 6*) and incubate the reaction for 30 min at room temperature. This will be used as the t_0 of the reaction.
 4. Add 5.2 μL of L-cysteine aqueous solution at 1 mM to the 130 μL left of the protein solutions (NIAU, NIAUF) to initiate the reaction. Incubate at 25 $^\circ\text{C}$.
 5. Withdraw 20 μL from the reaction mixture at desired times and rapidly drop the solution in a tube containing twofold excess of the maleimide derivative solution regarding the total number of thiols (*see Note 6*). Immediately mix by three cycles of aspiration/ejection using the same pipette. Incubate the reaction for 30 min at room temperature.
 6. Split each reaction into two parts of 10 μL each and add 3 μL of loading buffer with β -mercaptoethanol to one part and without β -mercaptoethanol to the other part. Incubate 30 min at room temperature.
 7. Load 200 pmoles of each protein reaction on SDS-PAGE (*see Notes 4 and 7*).
 8. Analyze the results (Fig. 5c). Check that mass loss is only observed under reducing conditions (Subheading 1.1). Otherwise, check for other cysteine modifications (Subheading 1.2). Quantify the bands corresponding to non-persulfidated and persulfidated proteins. Plot the ratio of the intensity of the bands corresponding to persulfidated and non-persulfidated species versus time. Simulate the curve with a relevant model to retrieve the rate constant.

3.2.3 Monitoring the Kinetic of Persulfide Transfer by TCA Quenching

An alternative method used for kinetic analysis is TCA precipitation. It is based on the denaturation by acidification to quench the reaction, which leads to precipitation of the proteins. The steps are summarized as following:

1. Reduce the proteins with 10 molar equivalents of DTT prior to any reaction and desalt them on a Sephadex G-25 column equilibrated with phosphate buffer.

2. Prepare 150 μL of the protein solutions (NIAU, NIAUF) at a final concentration of 20 μM in phosphate buffer. 379
380
3. Withdraw 20 μL of the protein mixture and mix it with 20 μL of cold TCA at 20%. Incubate on ice for 20 min. 381
382
4. In the meantime, add 5.2 μL of L-cysteine aqueous solution at 1 mM to the 130 μL of the protein (NIAU, NIAUF) solutions left to initiate the reaction. Incubate at 25 $^{\circ}\text{C}$. 383
384
385
5. Withdraw 20 μL from the reaction mixture at desired times and mix it with 20 μL of cold TCA at 20%. Incubate on ice for 20 min. 386
387
388
6. After incubation of TCA-precipitated samples, centrifuge at 15,000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. 389
390 AU4
7. Wash the pellets three times with cold acetone. 391
8. Leave the tubes standing in a fume hood for 30 min to evaporate residual acetone. 392
393
9. Resuspend the pellets in 20 μL alkylation buffer containing 2 molar equivalents of the maleimide derivative relative to the total number of thiols (*see Note 6*) and incubate the mixture for 30 min at room temperature. 394
395
396
397
10. Split each reaction into two parts of 10 μL each and add 3 μL of loading buffer with β -mercaptoethanol to one part and without β -mercaptoethanol to the other part. Incubate 30 min at room temperature. 398
399
400
401
11. Load 200 pmoles of each protein reaction on SDS-PAGE (*see Notes 4 and 7*). 402
403
12. Analyze the results. Similar kinetics must be observed when comparing the reaction quenched with SDS (Subheading 3.2.2) and TCA. Otherwise, it means that the quenching with SDS is not efficient. 404
405
406
407
408

4 Notes

1. Other types of alkylating agents can be used, such as iodoacetamide derivatives. 410
411
2. Other reducing agents of disulfides can be used, such as DTT and TCEP. 412
413
3. The main false positives expected are disulfides since persulfides react with reducing thiols to form disulfides. The other species (sulfenic, sulfinic, sulfonic acids, nitrosothiols, and sulfenamides) result from reaction with reactive oxygen and nitrogen species and are thus expected to occur under more specific conditions in the presence of oxidants. 414
415
416
417
418
419

4. The maleimide group is prominently reactive with free sulfhydryls at pH 6.5–8.0, but also reacts with amines, albeit at a much slower rate. To prevent side reactions with amines from buffers and proteins, amine-based buffers are avoided, and the samples are not heated before loading on gels if the maleimide is not yet neutralized. 420–425
5. The quantification is based on densitometry measurements of the Coomassie-stained bands on gel using a routine instrument of the laboratory, which enables quantitative determination of persulfidation within the precision limit of the detection technique. Other methods based on fluorescent alkylating agents may enhance the sensitivity and accuracy of the assay. 426–431
6. The thiols include all cysteine residues from all proteins and small thiol compounds such as L-cysteine that is used as a substrate for cysteine desulfurase to generate a persulfide. The total concentration of thiols is calculated by summing the concentration of small thiols and the concentrations of each protein multiplied by the number of their cysteine residues. 432–437
7. The amount of protein to be loaded on gel varies in function of its size: about 200 pmoles for 10–30 kDa proteins and 50 pmoles for 40–80 kDa proteins. ISCU is analyzed on 14% acrylamide gels and NFS1 on 10% gels. 438–441
8. The alkylation profiles show more fussy bands with Mal-PEG2k than Mal-P16 and Mal-dPEG (Fig. 4a). The Mal-PEG2k is not a pure compound but a mixture of polymers with a mean size of 2 kDa; thereby the size of the bands is linked to this mass heterogeneity. Mal-P16 and Mal-dPEG are defined compounds. 442–447
9. If the concentration of the alkylating agent needed to saturate all the cysteines residues is much higher than the stoichiometry regarding the total number of thiols, this may indicate either errors in the concentrations of the proteins or of the alkylating agent, presence of contaminating thiols, or a defective alkylating agent. 448–453
10. The formation of persulfide by NFS1 is completed in about 10 s and transferred to ISCU in less than 1 min in the presence of FXN [7], so that 1 min of incubation with L-cysteine is sufficient. 454–457

459 References

- | | |
|---|--|
| <p>461 1. Black KA, Dos Santos PC (2015) Shared-
462 intermediates in the biosynthesis of thio-
463 cofactors: mechanism and functions of cysteine
464 desulfurases and sulfur acceptors. <i>Biochim Bio-</i>
465 <i>phys Acta</i> 1853:1470–1480</p> | <p>2. Leimkühler S, Bühning M, Beilschmidt L (2017) Shared sulfur mobilization routes for tRNA Thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in prokaryotes and eukaryotes. <i>Biomol Ther</i> 7:5 466–469–470</p> |
|---|--|

- 471 3. Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee
472 R (2018) Chemical biology of H₂S signaling
473 through Persulfidation. *Chem Rev*
474 118:1253–1337
- 475 4. Cuevasanta E, Moller MN, Alvarez B (2017)
476 Biological chemistry of hydrogen sulfide and
477 persulfides. *Arch Biochem Biophys* 617:9–25
- 478 5. Benchoam D, Cuevasanta E, Moller MN,
479 Alvarez B (2020) Persulfides, at the crossroads
480 between hydrogen sulfide and thiols. *Essays*
481 *Biochem* 64:155–168
- 482 6. Smith AD, Agar JN, Johnson KA, Frazzon J,
483 Amster IJ, Dean DR, Johnson MK (2001) Sul-
484 fur transfer from IscS to IscU: the first step in
485 iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Am Chem*
486 *Soc* 123:11103–11104
- 487 7. Parent A, Elduque X, Cornu D, Belot L, Le
488 Caer JP, Grandas A, Toledano MB, D'Autreaux
489 B (2015) Mammalian frataxin directly
490 enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to
491 both ISCU and free thiols. *Nat Commun*
492 6:5686
- 493 8. Kambampati R, Lauhon CT (1999) IscS is a
494 sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of
495 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Bio-*
496 *chemistry* 38:16561–16568
- 497 9. Kambampati R, Lauhon CT (2000) Evidence
498 for the transfer of sulfane sulfur from IscS to
499 ThiI during the in vitro biosynthesis of
500 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J Biol*
501 *Chem* 275:10727–10730
10. Lauhon CT, Skovran E, Urbina HD, Downs
DM, Vickery LE (2004) Substitutions in an
active site loop of *Escherichia coli* IscS result in
specific defects in Fe-S cluster and thionucleo-
side biosynthesis in vivo. *J Biol Chem*
279:19551–19558
11. Bridwell-Rabb J, Fox NG, Tsai CL, Winn AM,
Barondeau DP (2014) Human frataxin acti-
vates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating
sulfur transfer chemistry. *Biochemistry*
53:4904–4913
12. Bailey TS, Pluth MD (2015) Reactions of
isolated persulfides provide insights into the
interplay between H₂S and persulfide reactiv-
ity. *Free Radic Biol Med* 89:662–667
13. Cavallini D, Federici G, Barboni E (1970)
Interaction of proteins with sulfide. *Eur J Bio-*
chem 14:169–174
14. Liu DK, Chang SG (1987) Kinetic study of the
reaction between cystine and sulfide in alkaline
solutions. *Can J Chem* 65:770–774
15. Gervason S, Larkem D, Mansour AB,
Botzanowski T, Muller CS, Pecqueur L, Le
Pavec G, Delaunay-Moisan A, Brun O,
Agramunt J, Grandas A, Fontecave M,
Schunemann V, Cianferani S, Sizun C, Tole-
dano MB, D'Autreaux B (2019) Physiologi-
cally relevant reconstitution of iron-sulfur
cluster biosynthesis uncovers persulfide-
processing functions of ferredoxin-2 and fra-
taxin. *Nat Commun* 10:3566

Chapitre 4 Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Dans ce second chapitre, je vais présenter les résultats concernant le mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC mitochondriale de souris. La première partie est consacrée à l'étude étape par étape du mécanisme d'assemblage qui nous a notamment permis de caractériser le centre à fer d'ISCU initiant la réaction d'assemblage et de mettre en évidence les rôles majeurs de la frataxine et de la ferrédoxine FDX2. La seconde partie est consacrée à une caractérisation détaillée du centre à fer d'ISCU, étude dans laquelle nous avons comparé les propriétés de fixation du fer de protéines ISCU de différents organismes, la bactérie *E. coli*, le champignon *Chaetomium thermophilum*, la souris *M. musculus* et l'homme *H. sapiens*, ainsi que les différents paramètres contrôlant l'insertion du fer dans ces ISCU (pH, état d'oligomérisation). Nous avons enfin déterminé la structure du site à fer d'ISCU de *M. musculus* par une combinaison de méthodes spectroscopiques (RMN, XAS, Mössbauer et RPE).

1. Mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC de *M. musculus*

1.1 Contexte de l'étude

Lorsque j'ai débuté ma thèse, toutes les reconstitutions de la machinerie ISC avaient été réalisées avec des protéines ISCU dont le contenu en zinc n'avait pas été déterminé et avec du DTT comme réducteur à la place de la ferrédoxine. La présence de zinc dans le site d'assemblage de différentes protéines ISCU purifiées avait été rapporté par plusieurs laboratoires sans que l'on sache si celui-ci pouvait avoir un rôle dans le processus d'assemblage ou s'il s'agissait d'un artefact de purification, car de grandes quantités de zinc peuvent être libérées au moment de la lyse cellulaire et venir se fixer à ISCU. Bien qu'il soit possible de former des centres Fe-S avec du DTT comme réducteur, cela posait la question de la pertinence physiologique de ces conditions et donc du mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S. En effet, il est connu depuis de nombreuses années qu'en mélangeant une source de fer et d'ions sulfures, il est possible de générer des centres [2Fe2S] et [4Fe4S]. Cette réaction est encore utilisée aujourd'hui pour reconstituer les centres Fe-S de protéines purifiées ayant perdu leur centre métallique au cours de la purification. Mais du point de vue du mécanisme de biosynthèse sur la protéine d'échafaudage ISCU, cette réaction ne semble pas physiologiquement pertinente. De plus, la formation de centre [4Fe4S] par la machinerie ISC ne semblait pas cohérente avec la présence *in vivo* des protéines ISCA qui sont dédiées à la formation des centres [4Fe4S].

La seconde question que nous avons abordée au cours de cette étude est le rôle de la frataxine. La capacité de la frataxine à lier du fer sous forme oligomérique a conduit à l'hypothèse qu'elle serait

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

une chaperonne à fer permettant l'insertion du fer dans la machinerie d'assemblage des centres Fe-S. Cependant, la forme initiale d'ISCU liée au fer n'ayant pas été caractérisée il était impossible de répondre à cette question. De plus, d'autres hypothèses sur son rôle fonctionnel avaient été avancées, notamment que FXN stimule la production d'ions sulfures et CyaY l'inhibe. Des travaux réalisés au laboratoire avaient montré qu'elle est aussi capable d'accélérer le transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU.

Dans cette première étude nous avons reconstitué la machinerie ISC de souris au complet, c'est-à-dire avec ISCU, le complexe NFS1-ISD11-ACP, le couple FDX2/FDXR et la frataxine FXN. L'objectif était de décomposer le mécanisme d'assemblage étape par étape. Pour cela nous avons cherché à caractériser le site de fixation du fer par différentes techniques biophysiques (dichroïsme circulaire, spectroscopie Mössbauer et RMN), puis nous avons étudié comment les ions sulfures sont produits au cours de la réaction. Pour cela nous avons utilisé la méthode ARBS pour suivre les persulfures et réaliser des études cinétiques.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

1.2 ARTICLE#2: Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide processing functions of ferredoxin-2 and frataxin

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9>

OPEN

Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin

Sylvain Gervason^{1,7}, Djibir Larkem ^{1,7}, Amir Ben Mansour^{1,7}, Thomas Botzanowski², Christina S. Müller³, Ludovic Pecqueur ⁴, Gwenaelle Le Pavec¹, Agnès Delaunay-Moisan¹, Omar Brun⁵, Jordi Agramunt ⁵, Anna Grandas ⁵, Marc Fontecave ⁴, Volker Schünemann³, Sarah Cianféroni², Christina Sizun ⁶, Michel B. Tolédano¹ & Benoit D'Autrèaux¹

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are essential protein cofactors whose biosynthetic defects lead to severe diseases among which is Friedreich's ataxia caused by impaired expression of frataxin (FXN). Fe-S clusters are biosynthesized on the scaffold protein ISCU, with cysteine desulfurase NFS1 providing sulfur as persulfide and ferredoxin FDX2 supplying electrons, in a process stimulated by FXN but not clearly understood. Here, we report the breakdown of this process, made possible by removing a zinc ion in ISCU that hinders iron insertion and promotes non-physiological Fe-S cluster synthesis from free sulfide in vitro. By binding zinc-free ISCU, iron drives persulfide uptake from NFS1 and allows persulfide reduction into sulfide by FDX2, thereby coordinating sulfide production with its availability to generate Fe-S clusters. FXN stimulates the whole process by accelerating persulfide transfer. We propose that this reconstitution recapitulates physiological conditions which provides a model for Fe-S cluster biosynthesis, clarifies the roles of FDX2 and FXN and may help develop Friedreich's ataxia therapies.

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France. ²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France. ³Fachbereich Physik, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Str. 56, 67663 Kaiserslautern, Germany. ⁴Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, Sorbonne Université, CNRS UMR 8229, PSL Research University, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France. ⁵Departament de Química Orgànica i IBUB, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain. ⁶Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France. ⁷These authors contributed equally: Sylvain Gervason, Djibir Larkem, Amir Ben Mansour. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.D. (email: benoit.dautreux@i2bc.paris-saclay.fr)

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are highly conserved and ubiquitous prosthetic groups of proteins, made of iron and sulfide (S^{2-}) ions, of which the [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters are the most common in biology^{1–4}. Organisms from the three life kingdoms: archaea, bacteria, and eukaryota have exploited the versatile properties of Fe-S clusters to perform essential biological functions, including ATP production, Krebs cycle, protein synthesis, and maintenance of genome integrity^{5,6}. The defects in Fe-S cluster biosynthesis lead to severe human pathologies, which underscores the importance to unravel the mechanism of their assembly^{2,7–12}. Fe-S clusters are biosynthesized *de novo* by specialized multi-protein machineries via a process conserved from bacteria to eukaryotes^{1,3,4,6,13}. In mitochondria, Fe-S clusters are assembled by the Iron Sulfur Cluster assembly machinery (ISC), which encompasses the scaffold protein ISCU, the NFS1-ISD11-ACP complex containing the cysteine desulfurase NFS1, a pyridoxal-phosphate (PLP) enzyme that generates a precursor of sulfide in the form of a cysteine-bound persulfide (Cys-SSH) by desulfurization of L-cysteine, ferredoxin 2 (FDX2) and its cognate reductase (FDXR) which together deliver electrons provided by NADPH and frataxin (FXN) which is required for efficient Fe-S cluster biogenesis^{1–4,9}. However, how the ISC machinery operates is not clearly understood and thereby, the biochemical roles of FDX2 and FXN are not established^{1,3,9}. Fe-S clusters biosynthesis is thought to rely on confined production of sulfide in the proximity of iron to promote formation of the iron-sulfide bond while preventing toxic diffusion of iron and sulfide ions, but no data have documented such a confined synthesis^{1,3}.

Several reconstitutions of both, bacterial and eukaryotic ISC machineries have attempted to address these questions^{14–21}. Bacterial ISC reconstitutions indicate that the homologue of NFS1, IscS, transfers several persulfides to multiple cysteines on the ISCU homologue, IscU, which suggests that sulfide production takes place on the scaffold protein^{22,23}. In mammals too, persulfides are transferred to ISCU, but only one of its cysteines becomes persulfidated^{14,24}. These reconstitutions have, however, not answered the question of the physiological reductant of the persulfide and whether its reduction is coupled to the presence of iron. The FDX2-FDXR reducing system is a good candidate for this reaction, but most reconstitutions used the non-physiological reductant dithiothreitol (DTT) instead, thereby occulting the possible function of FDX2 in this process^{15,16,18–20}. Moreover, DTT-dependent Fe-S cluster reconstitution cannot be considered as reproducing a physiological process since DTT reduces the persulfide of the cysteine desulfurase, which leads to formation of free sulfide that is not confined to ISCU^{14,21}. DTT was also shown to promote formation of [4Fe4S] clusters, the biosynthesis of which is apparently supported by the ISCA type proteins^{25–27}. The first study of the role of FDX2 was performed with bacterial Fdx2 and indicated that it promotes reductive coupling of [2Fe2S] clusters into [4Fe4S], which may not be physiologically relevant as formation of [4Fe4S] clusters on ISCU is possibly non-natural¹⁷. A FDX2-dependent assembly of [2Fe2S] clusters on ISCU was then reported with yeast proteins, thus suggesting that FDX2 is an important component, but evidence that FDX2 reduces the persulfide was not provided²¹. Moreover, we found that FDX2 is not able to reduce the persulfide transferred to ISCU, which questioned its role in persulfide reduction¹⁴.

Similarly, the role of frataxin (FXN) remains very controversial despite tremendous efforts to understand its biochemical function⁹. Since the discovery that Friedreich's ataxia (FA), a severe neurodegenerative and cardiac disease that is the most common form of recessive ataxia is caused by defective expression of FXN, this protein has been the focus of intense research^{2,9,10,28}. FXN was first proposed to operate as an iron chaperone or iron storage protein providing iron to the ISC machinery, but this model was

challenged by several *in vivo* studies^{9,29–31}. The reconstitutions of the ISC machinery with FXN did not provide a clearer picture either^{14,15,18,20,32}. The first reconstitution was performed with the bacterial system and unexpectedly showed that the bacterial homolog of FXN, CyaY, inhibits the rate of Fe-S cluster assembly under iron rich conditions, by slowing down sulfide release by IscS, which was interpreted as a mechanism needed to prevent uncontrolled Fe-S cluster formation^{15,32}. The reconstitutions of the mammalian system showed in contrast that FXN stimulates sulfide production and concomitantly iron entry in the ISC complex^{14,18,20}. However, these studies were performed with DTT instead of the FDX2-FDXR reducing system, which again questions their physiological relevance. Another study reported that yeast FXN stimulates persulfide formation on NFS1³³, but this could not be reproduced with the murine proteins¹⁴. The only reconstitution including both FDX2 and FXN concluded that FXN is strictly required for Fe-S cluster assembly, which may not be consistent with the dispensable role of FXN *in vivo*^{21,31,34–36}. FXN was also reported to stimulate persulfide transfer to ISCU, therefore promoting confined production of sulfide^{14,24}. However, FDX2 was unable to reduce the persulfide on ISCU, which prevented a direct correlation with Fe-S cluster assembly¹⁴.

Several studies also attempted to assess the iron binding properties of ISCU^{19,37–39}. Bacterial IscU was shown to bind iron in the μM range but another study could not detect interaction with either Fe^{2+} or Fe^{3+} ions^{19,39}. Yeast and drosophila ISCU proteins were reported to bind iron but not in the assembly site and it was not shown whether this iron containing form could sustain Fe-S cluster assembly^{37,38}.

We report here that a clue to these discrepancies is the presence of a zinc ion in the assembly site of ISCU, which has been persistently reported in bacterial and eukaryotic ISCU proteins^{40–45}. We show that this zinc ion hinders iron binding and precludes the reduction of the persulfide of ISCU by FDX2, thereby fostering reduction of the persulfide of NFS1 by L-cysteine, which leads to release of free sulfide and Fe-S cluster formation that cannot be considered as physiologically relevant since it is not confined to ISCU. By exchanging zinc with iron, we generate an iron-loaded ISCU protein allowing Fe-S clusters synthesis via FDX2-dependent reduction of the persulfide of ISCU. In this process, FXN is not required for iron insertion but stimulates persulfide transfer to ISCU. Moreover, both persulfide transfer and reduction require iron, which most likely ensures the coordination between sulfide production and iron availability in ISCU. We propose that the reaction performed by iron-loaded ISCU reproduces the physiological process of Fe-S cluster assembly, thus allowing the elucidation of the sequence of Fe-S cluster biosynthesis and the respective roles of FXN and FDX2.

Results

ISCU binds a Fe^{2+} ion upon removal of the Zn^{2+} ion. To address these questions, we first attempted to isolate an iron containing form of ISCU that would be competent for Fe-S cluster assembly. Analysis of the metal content of purified mouse ISCU revealed the presence of zinc as previously reported, but no iron^{40–42,46}. We measured 0.8 ± 0.1 zinc ion/ISCU and up to 1.0 ± 0.1 by incubation with additional zinc (Fig. 1a). Site-directed mutagenesis confirmed that the conserved amino acids of the Fe-S cluster assembly site of ISCU, C35, D37, C61, and H103, but not C104, are required for zinc binding, as also observed in the structures of human ISCU (Fig. 1a)⁴³. To probe binding of iron to the assembly site of ISCU, we sought for typical ligand-to-metal charge transfer (LMCT) bands of ferrous iron bound to cysteine, expected in the near UV domain^{47,48}. No such feature appeared

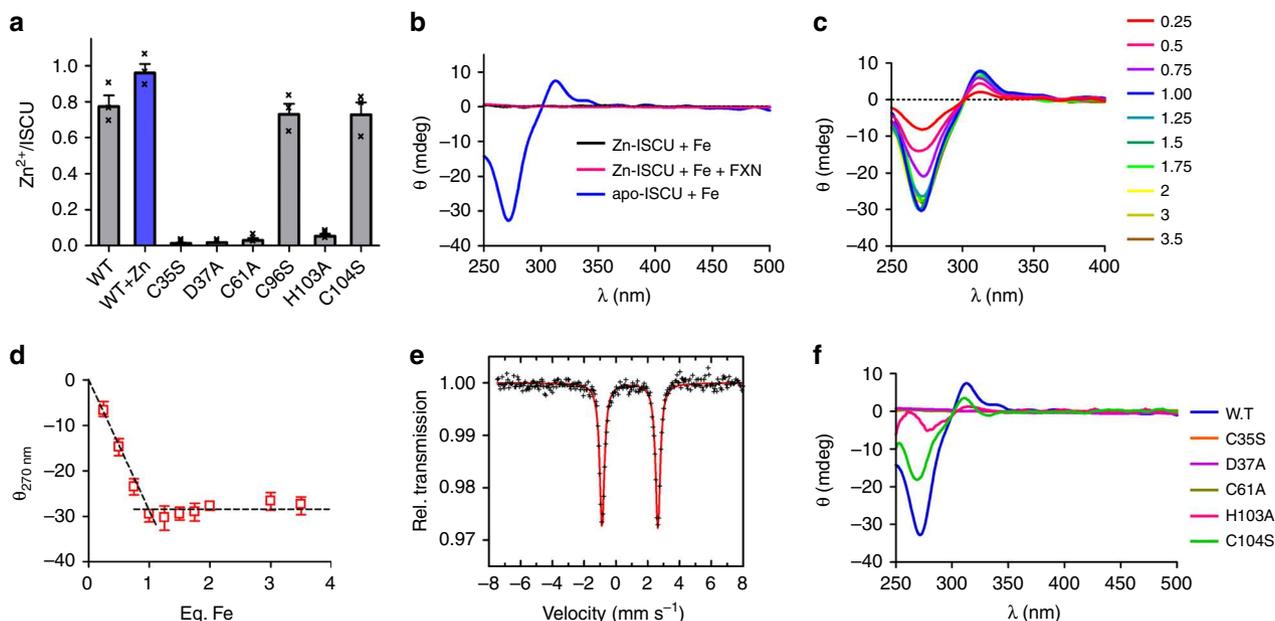


Fig. 1 Characterization of iron-loaded ISCU. **a** Zinc content of WT ISCU as purified (gray) and after zinc repletion (blue), and of the C35S, D37A, C61A, C96S, H103A, and C104S mutants, indicated as molar ratio of zinc ion per ISCU protein. **b** CD spectra of Zn-ISCU with (pink) and without FXN (black) and of apo-ISCU (blue), incubated with one molar equivalent of Fe^{2+} ions. **c** Titration of apo-ISCU with Fe^{2+} ions monitored by CD. Amounts of iron are indicated as molar ratio of iron to ISCU. **d** Plot of the values of the CD signal at 270 nm from the spectra in **c** at each concentration of iron. **e** Mössbauer spectrum of apo-ISCU incubated with one equivalent of ^{57}Fe enriched Fe^{2+} ions. The red solid line represents the best fits of the data achieved using the components displayed as black solid lines. See Supplementary Table 1 for parameters. **f** CD spectra of apoISCU proteins WT (blue), C35S (orange), D37A (purple), C61A (brown), H103A (pink), and C104S (green) incubated with one molar equivalent of Fe^{2+} ions. Errors bars represent standard deviation from $n=3$ independent experiments and source data for panels **a**, **d** are provided as a Source Data file

upon addition of Fe^{2+} to the zinc containing form of ISCU (Zn-ISCU), alone or in the presence of FXN (Fig. 1b). In contrast, adding Fe^{2+} to ISCU devoid of metal (apo-ISCU) produced absorptions at 270 nm, 310 nm, and 340 nm that are characteristic of Cys-S \rightarrow Fe(II) LMCT bands in the circular dichroism (CD) spectrum (Fig. 1b). Iron titrations by CD showed that ISCU binds ~ 0.95 Fe^{2+} ions in this site (Fig. 1c, d). Altogether, these data also show that FXN is not able to exchange zinc for iron and is neither required for iron insertion in apo-ISCU (Fig. 1b). Moreover, we did not detect any iron or zinc in purified FXN, which strengthened the idea that FXN is not involved in iron insertion.

We next evaluated the effect of iron on the structure of apo-ISCU by NMR spectroscopy, since ISCU was reported to exist in two different conformational states, structured (denoted S) and disordered (denoted D), and zinc was shown to stabilize the S state⁴⁹. The NMR spectrum of apo-ISCU displayed broad central signals that were assigned to the D state and more dispersed resonances corresponding to the S state (Supplementary Fig. 1a). Integration of the tryptophan W74 signals indicated that $\sim 30\%$ of apo-ISCU was in the S form (inset of Supplementary Fig. 1a). Upon addition of iron, the central part of the spectrum became more resolved and additional dispersed signals appeared (Supplementary Fig. 1b). Two signals were visible for W74: an intense one slightly shifted relative to that of the S form of apo-ISCU, and a weak one at the position of the D form of apo-ISCU. By analogy, we assigned the weak signal to remaining apo-ISCU in the D form and the shifted intense signal to an iron containing S form. Integration of the W74 signals indicated that $\sim 80\%$ of ISCU was in the S state.

To further assess the iron binding properties of ISCU, we used Mössbauer spectroscopy. The Mössbauer spectrum of apo-ISCU incubated with one equivalent of Fe^{2+} revealed the presence of two species (Fig. 1e, Supplementary Table 1). The parameters of

the major component (component 1, 85%) were indicative of a high spin Fe(II) center coordinated in a mixed environment by one or two cysteines and two or three N/O ligands, consistent with the CD spectrum (Supplementary Tables 1 and 2 and Supplementary Note 1)⁵⁰. The high value of the quadrupole splitting ($3.51 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$), that is growing with asymmetry, is in agreement with this mixed coordination. Remarkably, the amount of component 1 was similar to the proportion of ISCU in the S state, which suggests that binding of iron to this site promotes conversion of the D to S state. In contrast, the isomeric shift of the minor species (component 2, 15%) was consistent with a Fe(II) center coordinated by five or six N/O atoms but no sulfur (Supplementary Tables 1 and 2). The parameters of this species were not identical to those of free iron and this species was absent when apo-ISCU was incubated with a sub-stoichiometric amount of iron, which suggests that component 2 is iron bound to ISCU in a lower affinity site compared to component 1 (Supplementary Fig. 1c, d and Supplementary Table 1).

To identify the ligands of the iron ion in these sites, we used site-directed mutagenesis. The C35S, D37A, and C61A substitution mutants lacked the typical LMCT bands when incubated with ferrous iron (Fig. 1f). Very weak absorptions were detected for the H103A mutant but its Mössbauer spectrum lacks the typical signal of the iron-cysteinyll site (Fig. 1f, Supplementary Fig. 1e and Supplementary Note 1). In contrast, the C104S mutant exhibited intense Cys-S \rightarrow Fe(II) LMCT absorption bands and the major species detected by Mössbauer spectroscopy (65%) displayed parameters nearly identical to those of the WT protein (Fig. 1f, Supplementary Fig. 1f and Supplementary Note 1). The lack of the minor species (component 2) in the H103A and C104S mutants further suggested that H103 is a ligand of this iron ion and that the C104S mutation impairs iron binding to this site (Supplementary Note 1). We conclude that the zinc ion prevents iron binding in the assembly site of ISCU, which may explain the

lack of interaction with iron previously observed^{38,39}. Removing zinc allows binding of a Fe^{2+} ion in the assembly site via the C35, D37, C61, and H103 amino acid residues, which stabilizes the S state of ISCU. The minor component may correspond to iron bound in a distorted assembly site via H103 in the D state.

Physiologically relevant assembly of Fe-S cluster by Fe-ISCU.

We then tested the ability of both, Fe-ISCU (apo-ISCU incubated with one equivalent of Fe^{2+} ions) and Zn-ISCU in the presence of one equivalent of iron, to assemble a Fe-S cluster, under catalytic conditions with all the components of the ISC machinery (the NFS1-ISD11-ACP (NIA) complex, FXN, FDX2 and FDXR) at a 1:10 molar ratio relative to ISCU, NADPH as a source of electrons and L-cysteine in stoichiometric amounts relative to ISCU. Fe-S cluster assembly was monitored by CD and UV-visible spectroscopies. The reaction with Fe-ISCU led to appearance of a species within 3 min, with spectroscopic features identical to those reported for the oxidized form of the [2Fe2S] cluster in ISCU (Fig. 2a, b)^{16,21}. In contrast, the reaction with Zn-ISCU generated virtually no Fe-S cluster (Fig. 2a), in agreement with the hindrance of iron binding in the assembly site when zinc is bound (Fig. 1b). Mössbauer spectroscopy and native mass spectrometry showed that exclusively [2Fe2S]²⁺ clusters were generated, in contrast to previous reconstitutions which reported formation of both [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters (Fig. 2c, d, Supplementary Fig. 1h, i and Supplementary Note 2)^{16,18}.

Moreover, native mass spectrometry showed that the [2Fe2S] cluster was hosted in a monomer of ISCU (Fig. 2d). The identification of two different iron binding sites by Mössbauer spectroscopy further indicated that the [2Fe2S] cluster was in an asymmetrical arrangement, in agreement with crystal structures and spectroscopic studies suggesting a three Cys, one Asp mixed coordination in a monomer of ISCU (Fig. 2c, Supplementary Note 2)^{17,45,51,52}.

Iron and cysteine titrations showed that approximately two irons and two cysteines per ISCU were required to form the [2Fe2S] cluster when starting from apo-ISCU, with yields in the range of 90% of reconstituted ISCU, which confirms the stoichiometry of one [2Fe2S] cluster per ISCU (Fig. 2e, f). Importantly, these data also indicate that the reaction is highly efficient, with processing of nearly all L-cysteine and iron added into [2Fe2S] clusters. Similar spectra were collected when the reaction was performed with stoichiometric amounts of the NIA complex, ISCU and FXN, which attested that the Fe-S cluster is generated within the NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN (NIAUF) complex (Supplementary Fig. 2a).

We then evaluated the dependence of this reaction on FXN and FDX2. In reactions missing FDX2, the assembly was compromised, consistent with the absolute cellular requirement of FDX2 for Fe-S cluster biogenesis (Fig. 2g)^{53,54}. When FXN was omitted, the assembly was slowed down, consistent with the significant decrease of Fe-S cluster biogenesis activity in cells lacking FXN (Fig. 2g)^{31,34,35}. In conclusion, the reconstituted system with

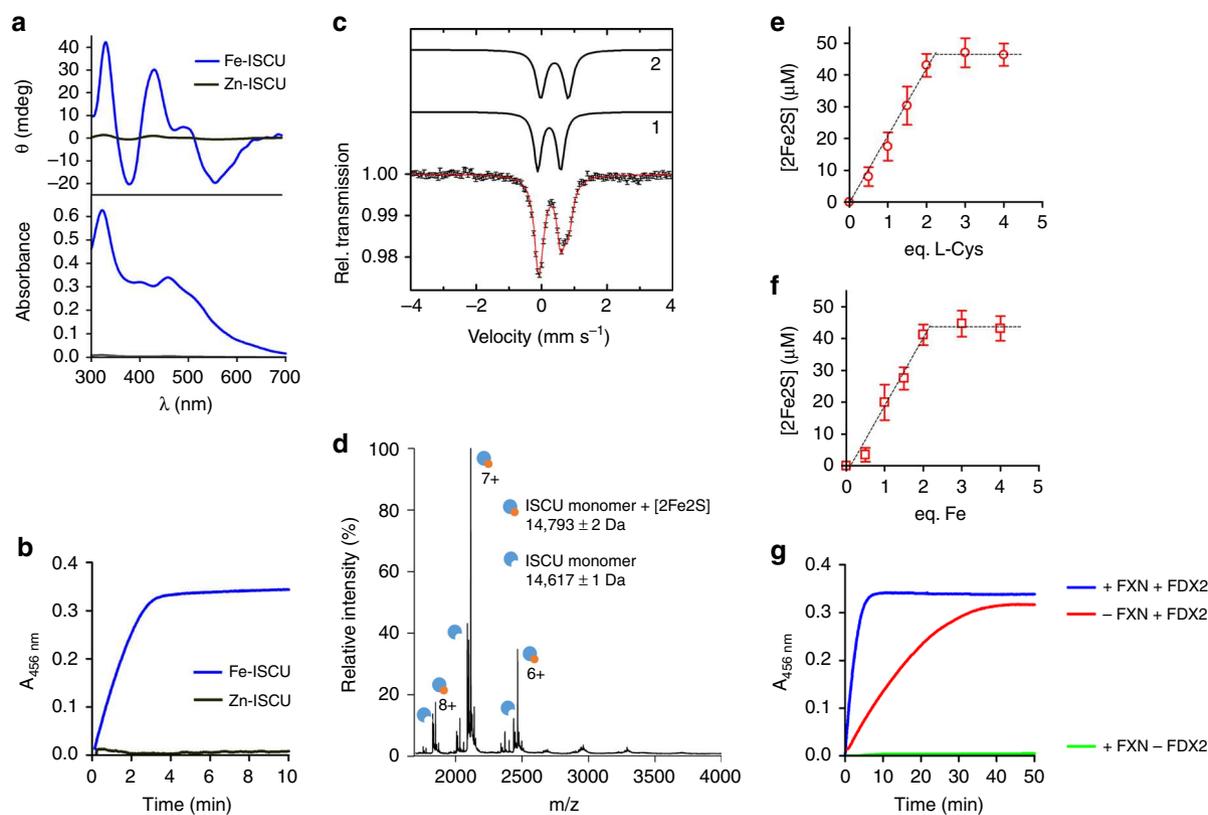


Fig. 2 Fe-S cluster assembly by Fe-ISCU and Zn-ISCU. **a** UV and CD spectra of Fe-S cluster reconstitution reactions by Fe-ISCU (blue) and Zn-ISCU (black) performed under catalytic conditions with one equivalent of L-cysteine. One equivalent of iron was added in the case of Zn-ISCU. **b** Kinetics of Fe-S cluster reconstitution by Fe-ISCU (blue) and Zn-ISCU (black) as described in **a**, monitored at 456 nm. **c** Mössbauer spectrum of reconstitution performed with apo-ISCU in the presence of two equivalents of iron and L-cysteine. The red solid line represents the best fit of the data achieved using the two components displayed as black solid lines (See Supplementary Table 1 for parameters). **d** Native MS spectra of reconstitution performed with apo-ISCU in the presence of two equivalents of iron and L-cysteine. **e, f** Titrations of [2Fe2S] clusters in ISCU for various amounts of L-cysteine (**e**) and iron (**f**) (Source data are provided in Supplementary Fig. 2b, c and as a Source Data file). **g** Fe-S cluster reconstitution assays by Fe-ISCU in reactions containing all components as described in **a** (blue) and missing FDX2 (green) or FXN (red)

Fe-ISCU appears to recapitulate biological conditions of Fe-S cluster assembly. Furthermore, the reaction performed without FXN led to formation of a [2Fe2S] cluster with identical features as those observed in the presence of FXN and in similar yields as the complete reaction, thus suggesting that FXN does not change the outcome of the reaction, but only modulates its rate (Fig. 2g, Supplementary Fig. 2d).

Mechanism of FDX2-based Fe-S cluster assembly by Fe-ISCU.

We next examined how the persulfide of NFS1 was reduced and sulfide incorporated as a Fe-S cluster. We previously showed using a protein persulfidation assay that NFS1 transfers its persulfide to the cysteine C104 of ISCU¹⁴. Using this assay, we monitored persulfide transfer to Fe-ISCU and Zn-ISCU and found that both acquire a persulfide from NFS1, on a single cysteine (Fig. 3a). Lack of transfer with the C104S mutant provided evidence that this residue serves as the persulfide receptor, and mass spectrometry indicated that a single sulfur atom is incorporated in ISCU (Fig. 3b–d)¹⁴. In the absence of metal, persulfide transfer was abolished (Fig. 3b), despite formation of a complex between apo-ISCU, FXN, and the NIA complex (Supplementary Fig. 3a and Supplementary Note 3), which indicates that the metal ion is required for persulfide transfer. Adding FDX2 to the persulfidated form of Fe-ISCU led to disappearance of the persulfide and concomitant formation of a Fe-S cluster, thus indicating that FDX2 reduces the persulfide into sulfide (Fig. 3a left panel, 3e, 3f). In contrast, FDX2 was unable to reduce the persulfide of Zn-ISCU, which explains the inability of this form to assemble a Fe-S cluster (Fig. 3a right panel). Persulfide reduction was also precluded in the absence of metal, which rules out the idea that zinc could be inhibitory and instead points to a specific requirement of iron for persulfide reduction (Fig. 3g).

Since formation of a [2Fe2S] cluster requires two sulfides, we asked whether a second sulfide was provided by NFS1 either directly, by FDX2-mediated reduction of the persulfide of NFS1, or indirectly, via a second transfer-reduction process following reduction of the first one. In both cases, a concomitant disappearance of the persulfides of NFS1 and ISCU was expected upon addition of FDX2. To prevent reloading of NFS1 with a persulfide, which would otherwise mask both direct reduction and second transfer, we used sub-stoichiometric amounts of L-cysteine. These experiments were performed by incubating reaction mixtures containing the NFS1-Fe-ISCU complex with various amounts of L-cysteine from sub-stoichiometric to excess, prior to adding FDX2. The persulfidation states of NFS1 and ISCU were analyzed before and after addition of FDX2. Upon addition of FDX2, the persulfide of ISCU was reduced as described in the previous section, but the persulfide of NFS1 did not disappear, thus establishing that only one sulfide is provided to ISCU (Fig. 3h, i). As ISCU binds only one iron ion, formation of a [2Fe2S] cluster likely requires dimerization of ISCU followed by segregation of the Fe-S cluster on one of the two subunits.

FXN stimulates persulfide transfer to Fe-ISCU. We next inspected the effect of FXN on each step of the assembly process. The yeast FXN homologue was proposed to stimulate persulfide formation on NFS1³³. However, this effect could not be observed with the murine system, therefore indicating that FXN operates at a later step¹⁴. We first tested the effect of FXN on persulfide transfer. We previously reported that persulfide formation on NFS1 is much faster than persulfide transfer, i.e., that persulfide transfer is the rate-limiting step of this process¹⁴. Thereby, the global rate of persulfidation of ISCU upon addition of L-cysteine to the NIAU

complex, which encompasses both, persulfide formation on NFS1 and its transfer to ISCU, only reflects persulfide transfer, thus allowing direct determination of the rate of persulfide transfer by measuring the rate of the two-step reaction. In the absence of FXN, persulfide transfer still occurred and was completed in about 30 min (Fig. 4a, upper panel). In the presence of FXN, the rate of the reaction was markedly increased, with a transfer nearly complete in 5 min (Fig. 4a, lower panel). The same effect was observed with Zn-ISCU, consistent with our previous observation with as-purified ISCU (Fig. 4b)¹⁴. Since the rates of persulfidation of Fe-ISCU and Zn-ISCU are both much lower than the previously reported rate of persulfide formation on NFS1, persulfide transfer appears rate-limiting here too. Therefore, the effects of FXN on the rates of persulfidation of Fe-ISCU and Zn-ISCU indicate that FXN stimulates persulfide transfer in both cases. In contrast, FXN did not affect the rate of persulfide reduction (Fig. 4c).

Overall, these data suggest that FXN modulates the rate of Fe-S cluster assembly by acting solely on the persulfide transfer step, which is mechanistically feasible only if persulfide transfer is the rate-limiting step of the whole process. We thus compared the rate constants of persulfide transfer determined by the alkylation assays (Fig. 4a, d) with those of (i) persulfide reduction by FDX2 that is combined with formation of the [2Fe2S] cluster and determined by monitoring Fe-S cluster formation upon addition of FDX2 to a persulfidated form of the NIAU complex (Fig. 4c), and (ii) the global reaction of Fe-S cluster assembly monitored by UV-visible spectroscopy upon addition of L-cysteine (Fig. 4e), using stoichiometric amounts of the NFS1-ISCU-ACP complex and Fe-ISCU. The values of the rate constants of persulfide transfer and Fe-S cluster assembly were comparable, both in the presence and absence of FXN, and much lower than the rate constant of persulfide reduction by FDX2, thus indicating that persulfide transfer is the rate-limiting step of the whole process (Fig. 4d–f). This provides evidence that FXN stimulates Fe-S cluster biosynthesis by accelerating persulfide transfer to Fe-ISCU.

Zn-ISCU promotes Fe-S cluster synthesis from free sulfide. We showed above that Zn-ISCU cannot assemble a Fe-S cluster when incubated with one equivalent of iron and L-cysteine. However, Fe-S cluster reconstitutions with as-purified ISCU which presumably contained zinc, were previously reported^{14–16,18,20,21}. We indeed observed reconstitution of a Fe-S cluster by Zn-ISCU in the presence of iron, but only when the concentration of L-cysteine was raised above stoichiometry (Fig. 5a). The spectroscopic features of the Fe-S cluster generated by Zn-ISCU were identical to those of the [2Fe2S] cluster reconstituted by Fe-ISCU (Fig. 5b). Moreover, the rate of the reaction was slowed down in the absence of FXN, as reported for the reconstitutions performed with as-purified ISCU (Fig. 5c)^{14,18,20}. This suggests that this reaction reproduces the phenotype of cells lacking FXN. However, this reaction was about 50 times slower relative to the reaction with Fe-ISCU and required about 30 times more L-cysteine to reach the same yield in Fe-S clusters, which accounted for only 5% of L-cysteine incorporated (Fig. 5a). Furthermore, in the absence of FDX2, the reaction was only slowed down, not abolished, which suggests that this reaction does not reproduce the physiology since FDX2 is essential for Fe-S cluster biogenesis in vivo (Fig. 5c)^{53,54}.

We thus examined the mechanism of the reaction performed by Zn-ISCU. Since the persulfide of ISCU is not reducible in the presence of zinc (Fig. 3a), the origin of sulfide was likely NFS1. In the absence of FDX2, Fe-S clusters were still formed, which indicated that FDX2 is not the main reductant in this reaction (Fig. 5c). Instead, the dependency of the rate of the reaction on the concentration of L-cysteine suggests that L-cysteine is the

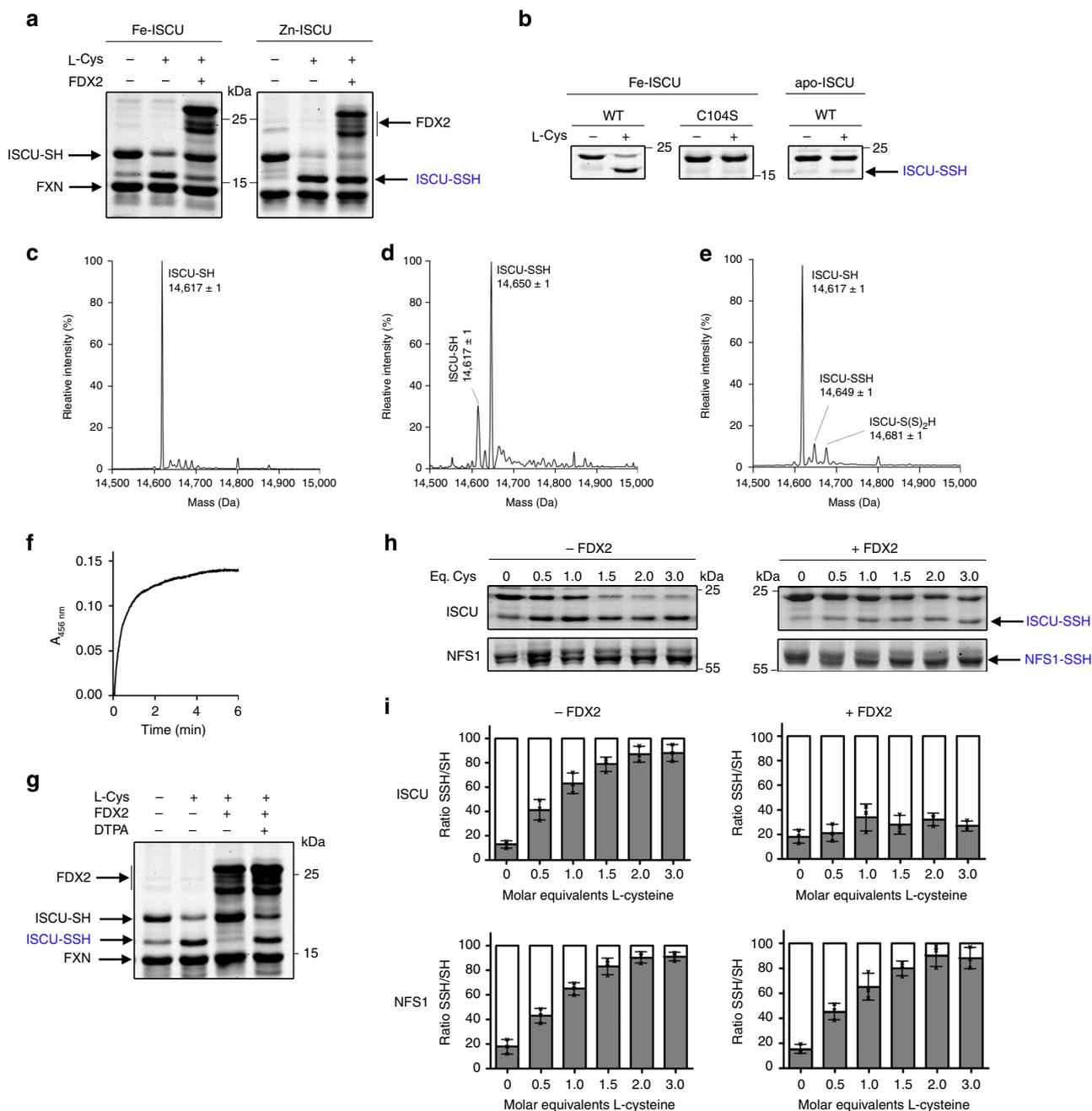


Fig. 3 Sequence of Fe-S cluster assembly and functional role of FDX2. **a** Persulfidation of ISCU monitored by the alkylation assay in the NIAUF complex containing either Fe-ISCU or Zn-ISCU without L-cysteine, with L-cysteine and after addition of FDX2. **b** Persulfidation of the C104S mutant of Fe-ISCU and of apo-ISCU in the NIAUF complex upon addition of L-cysteine. **c–e** ESI-Q/TOF deconvoluted mass spectra of Fe-ISCU upon incubation of the NIAUF complex without (**c**) or with (**d**) L-cysteine and after Fe-S cluster reconstitution (**e**), analyzed under denaturing conditions (see Supplementary Fig. 4 for raw spectra and Supplementary Table 3 for expected masses). **f** Fe-S cluster formation monitored at 456 nm upon addition of FDX2 to the NIAUF complex containing persulfidated Fe-ISCU. **g** Effect of a metal chelator (DTPA) on persulfide reduction by FDX2. **h** Effect of FDX2 on the persulfide of NFS1 and Fe-ISCU for various amounts of L-cysteine indicated as molar ratios. **i** Quantifications of the gels in **h** expressed as the relative percentages of persulfidated (gray bar) and non-persulfidated (white bar) proteins. Error bars represent standard deviation from $n = 3$ independent experiments, uncropped gels underlying panels **a**, **b**, **g**, **h** and source data of panel **i** are provided as Source Data file

reductant (Fig. 5a). This assumption is corroborated, on one hand, by our previous data demonstrating that L-cysteine is able to reduce the persulfide of NFS1, a reaction which generates free sulfide through intermediate formation of persulfidated L-cysteine, and is stimulated by FXN, and, on the other hand, by the sigmoidal behavior observed in the absence of FDX2 that is a hallmark of the accumulation of an intermediate species (Fig. 5c)¹⁴. We thus propose that the poorly efficient Fe-S cluster assembly reaction

performed by Zn-ISCU proceeds via formation of free sulfide and is stimulated by FXN at the stage of sulfur transfer to L-cysteine, as previously reported with as-purified ISCU¹⁴.

Discussion

We show here that upon removal of its zinc ion, ISCU can bind a Fe²⁺ ion in the assembly site and carry out Fe-S cluster assembly

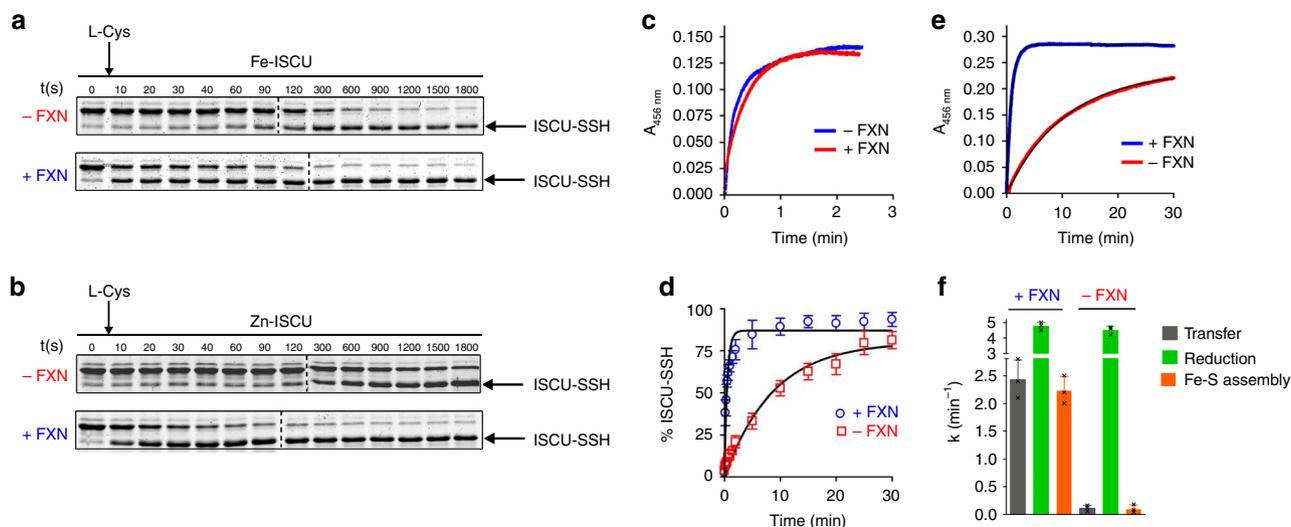


Fig. 4 Functional role of FXN. **a, b** Kinetics of persulfide formation on Fe-ISCU (**a**) and Zn-ISCU (**b**) in the NIAU complex upon addition of L-cysteine, in the absence (red) and presence (blue) of FXN. **c** Kinetics of Fe-S cluster formation upon addition of FDX2 in the absence (red) and presence (blue) of FXN to the NIAU complex pre-incubated with L-cysteine. **d** Plot of percentage of persulfidated Fe-ISCU determined by quantification of the gels in **a**. The black lines represent the fits of data using a first order equation. **e** Kinetics of Fe-S cluster reconstitution under stoichiometric conditions with and without FXN. The black lines represent the fits of data using a first order equation. **f** Rate constants of persulfide transfer (gray bars), persulfide reduction combined with formation of the [2Fe2S] cluster (green bars) and global Fe-S cluster assembly upon addition of L-cysteine (orange bars), in the absence and presence of FXN, determined from data in **d, c, e** using stoichiometric amounts of the NFS1-ISD11-ACP complex and Fe-ISCU (see Methods for rate constant determination). Error bars represent standard deviation from $n = 3$ independent experiments, uncropped gels underlying panels **a, b** and source data of panel **d, f** are provided as Source Data file

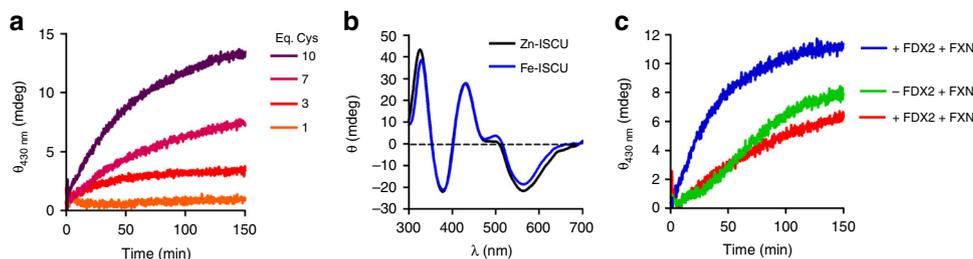


Fig. 5 Fe-S cluster reconstitution with Zn-ISCU with excess L-cysteine. **a** Kinetics of Fe-S cluster assembly by Zn-ISCU (100 μ M) monitored by CD at 430 nm, performed under catalytic conditions with the ISC components (NFS1-ISD11-ACP, FXN, FDX2, and FDXR), iron (200 μ M) and various amounts of L-cysteine as indicated. **b** CD spectra of Fe-S cluster reconstitution assays by Zn-ISCU as performed in **a** with 1 mM of L-cysteine. The spectra were normalized to the spectrum obtained with Fe-ISCU. **c** Kinetics of Fe-S cluster assembly by Zn-ISCU with 10 equivalents of L-cysteine in standard conditions (blue) and in reactions missing FXN (red) or FDX2 (green);

with high efficiency, as virtually all iron and L-cysteine are incorporated in the form of [2Fe2S] clusters. Our step-by-step analysis indicates that the mechanism of assembly relies on the transfer of the persulfide of NFS1 to ISCU that is subsequently reduced into sulfide by FDX2, leading to formation of a [2Fe2S] cluster in a monomer of ISCU (Fig. 6). These data thus provide evidence that FDX2 operates in persulfide reduction and is essential since Fe-S cluster assembly was compromised in its absence. Our data also provide information on the nucleation process leading to a dinuclear [2Fe2S] cluster. As only one iron is initially present in ISCU and only one sulfide ion is generated per ISCU by FDX2, we postulate that formation of the Fe-S cluster requires dimerization of ISCU to generate a bridged [2Fe2S] cluster at the interface of the two subunits, which then segregates on one of the two monomers. Two structures of the NFS1-ISD11-ACP complex were reported which both displayed a dimeric complex but with distinct topologies^{43,44}. In the structure reported by Boniecki et al., the two ISCU proteins are bound at the opposite ends of the complex thus precluding dimerization⁴³. Whereas in the structure reported by Cory et al., although it does

not contain ISCU, modelling predicts that the two ISCU proteins are very close to each other, thus consistent with formation of a dimer within the complex⁴⁴.

Our data also indicate that a key feature of the Fe-ISCU based reaction is the iron-dependency of both persulfide transfer and reduction, which most likely ensure that sulfur transfer and sulfide production are coordinated with iron availability in ISCU, thereby preventing futile persulfide transfer cycles and allowing instantaneous binding of the nascent sulfide to the nearby iron. Strikingly, zinc and iron appear interchangeable for persulfide transfer. The metal ion might function as a Lewis acid creating an electrophilic character on the sulfane sulfur of the persulfide of NFS1 to facilitate the nucleophilic attack by the receptor cysteine of ISCU. In contrast, persulfide reduction by FDX2 is operative with iron, but precluded with zinc. During assembly, the iron ion switches from the +2 state in Fe-ISCU to the +3 state in the [2Fe2S]. This suggests that the iron ion is the source of one of the two electrons needed for persulfide reduction, with the other one being donated by the [2Fe2S] cluster of FDX2. This could explain why reduction does not occur on Zn-ISCU.

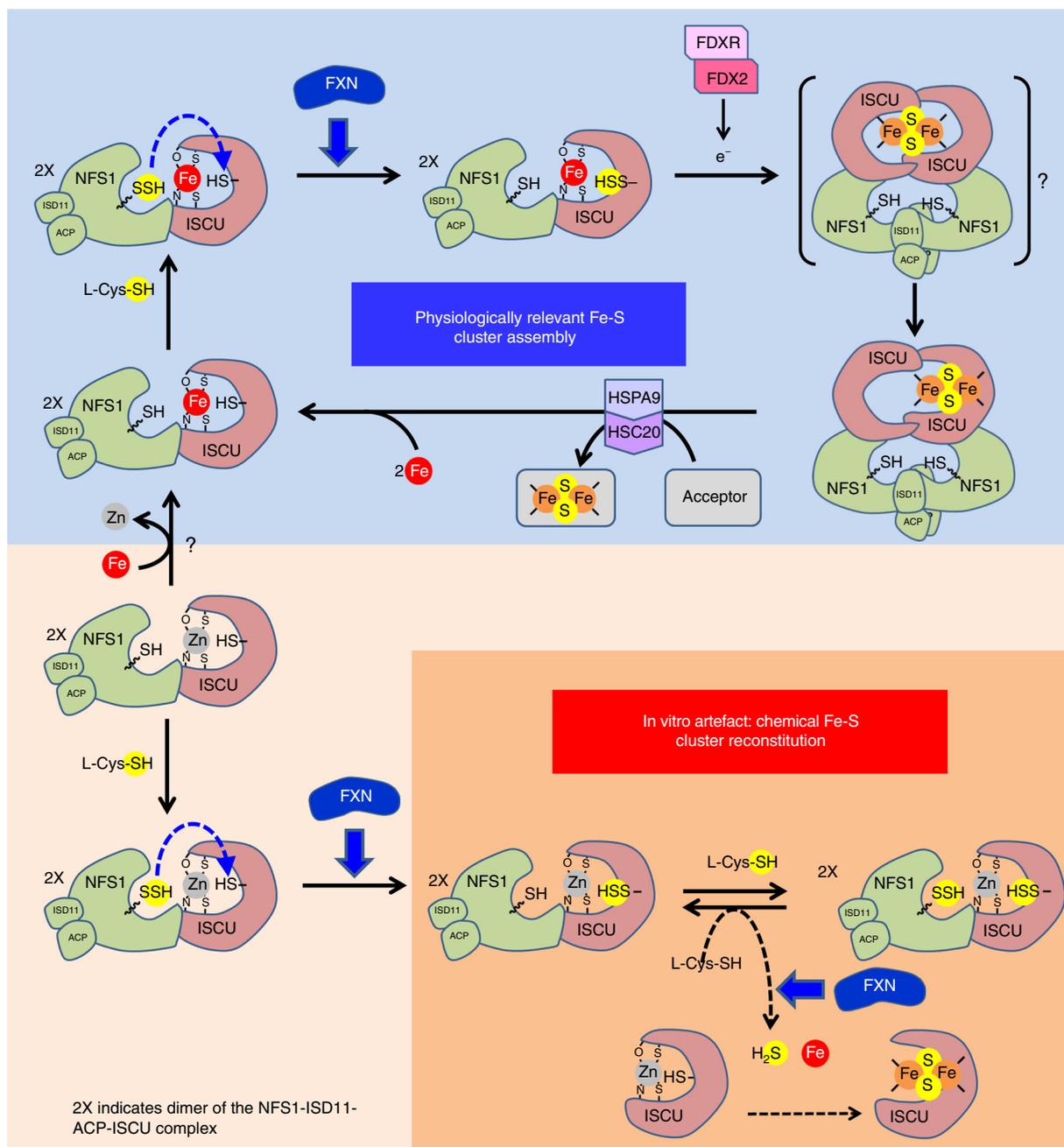


Fig. 6 Proposed model of Fe-S cluster biosynthesis. The upper part describes physiologically relevant Fe-S cluster assembly by Fe-ISCU. Upon reaction with L-cysteine, a persulfide is generated on the catalytic cysteine of NFS1 that is transferred to the cysteine C104 of Fe-ISCU and FXN accelerates this reaction. The persulfide of Fe-ISCU is then reduced into sulfide by FDX2, which leads to formation of a [2Fe2S] cluster. The [2Fe2S] cluster is putatively formed by dimerization of ISCUs that is assisted by the dimeric structure of the NFS1-ISCU-ACP complex. The bridged [2Fe2S] cluster subsequently segregates on one subunit and is transferred to recipient apo-proteins by the HSPA9/HSC20 chaperone system. Reloading of ISCUs with iron ions, by a still ill-defined chaperone, allows subsequent turnovers. The lower part describes the reaction with Zn-ISCU that is not physiologically relevant. Upon reaction with L-cysteine, a persulfide is generated on NFS1 and is transferred to the cysteine C104 of Zn-ISCU. FXN enhances the rate of this reaction, but the persulfide of Zn-ISCU is not reduced by FDX2. Upon reaction with a second molecule of L-cysteine, the persulfide of NFS1 is regenerated. This persulfide is reduced by thiols such as L-cysteine which leads to formation of free sulfide that combines with free iron to form a Fe-S cluster in Zn-ISCU in a slow and poorly efficient process akin to chemical reconstitution (orange background). FXN accelerates the reduction of the persulfide of NFS1 by thiols

This model contrasts with the one drawn from the data obtained with Zn-ISCU (Fig. 6). When zinc is in the assembly site, the impeded reduction of the persulfide of ISCUs by FDX2 fosters the reduction of the persulfide of NFS1 by L-cysteine, which leads to formation of persulfidated L-cysteine (Cys-SSH) that is decomposed into sulfide by another molecule of L-cysteine, as previously described with as-purified ISCUs¹⁴. FDX2 also

promotes this reaction most likely by reducing Cys-SSH. The sulfide ions then combine with iron to form a Fe-S cluster that is inserted in ISCUs in a poorly efficient way akin to chemical reconstitution^{1,14}. This reaction might only occur in vitro, as in vivo, the persulfidated cysteine and the sulfide ions will not remain in ISCUs but will diffuse throughout the cell. Moreover, the zinc ion was shown to decrease the rate of sulfide production

which may help mitigate this side-effect *in vivo*⁴⁶. We thus propose that the Fe-ISCU based reconstitution is the one that recapitulates the physiological Fe-S cluster assembly process.

Since the presence of zinc has been persistently reported in eukaryotic and prokaryotic recombinant ISCU proteins, we presume that all previous Fe-S cluster reconstitutions were describing the non-physiological Fe-S cluster assembly process. Nevertheless, although the zinc ion hinders physiologically relevant Fe-S cluster assembly on ISCU, by enabling persulfide transfer to ISCU and by preventing reduction by FDX2, it might convert ISCU into a sulfur-transferase as proposed for the *Bacillus subtilis* SufU protein, a closely related homolog of ISCU⁵⁵.

Our data indicate that the function of FXN is to accelerate persulfide transfer to Fe-ISCU that is the rate-limiting step of Fe-S cluster synthesis. Further, the effect of FXN, as it does not modify the nature of the Fe-S cluster formed on ISCU and its yield, points to a regulatory function, which fits to FXN non-essential role *in vivo*^{31,34–36}. FXN also enhances persulfide transfer to Zn-ISCU, as previously reported with as-purified ISCU¹⁴, which might be linked to the above-proposed sulfur-transferase function of Zn-ISCU. FXN thus appears as an enhancer of metal-dependent persulfide transfer reactions. It may operate by either promoting persulfide binding to the metal center, by modifying the coordination sphere of the metal ion or by deprotonating the receptor cysteine of ISCU to increase its nucleophilic ability. Addressing these questions will be critical to understand the biochemical function of FXN.

A reconstitution of the yeast ISC machinery that included FDX2, reported that FXN is critical for Fe-S cluster synthesis, a conclusion not supported by our data²¹. In these experiments, a significant amount of Fe-S cluster (30%) was still formed in the absence of FDX2, and also in reactions lacking FXN, which are in fact typical features of the Zn-ISCU-based reaction (Fig. 5c). Therefore these data might not be used to draw any conclusions on the physiological role of FXN in Fe-S cluster biosynthesis. FXN was also proposed to deliver iron to the ISC machinery based on its ability to bind iron. However, this hypothesis has been questioned by several studies^{9,29,36}. Anyhow, if indeed FXN carries this additional function, then how would zinc be exchanged? This would require another enzyme since FXN is not able to exchange zinc for iron. Our data instead indicate that FXN does not bind iron and is not required for iron insertion. Therefore, its biochemical role seems to be restricted to the stimulation of persulfide transfer.

Altogether, our data afford evidence that FXN operates in Fe-S cluster biogenesis as a kinetic activator of persulfide transfer, a function that probably is conserved in prokaryotes given the homologies of prokaryotic and eukaryotic frataxin proteins. Such a regulatory function further suggests that the expression of FXN is tightly regulated in order to adapt Fe-S cluster biogenesis to the cellular demand. Our results thus open perspectives to unravel the pivotal role of FXN in Fe-S cluster biogenesis that will help better understand the pathophysiology of FRDA and research in the development of therapeutic treatments⁹.

Methods

Chemicals and materials. Luria Bertani medium, protease inhibitor cocktail (sigmafast), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), urea, tris base, tris HCl, sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol (DTT), L-cysteine, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), human His₆-thrombin, Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), ferrous ammonium sulfate ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$), imidazole, zinc sulfate (ZnSO_4), 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR), 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate (Ferrozine), ascorbic acid and acrylamide:bis-acrylamide (29:1) solutions were from Sigma-Aldrich. HiTrap chelating HP column (5 ml), PD-10 desalting, HiPrep

Desalting 26/10, HiLoad 16/60 prep grade Superdex 200 and Superdex 75 columns were from GE Healthcare; Amicon Ultra centrifugal filter ultracel 10 and 30 kDa from MILLIPORE, MicroBio-Spin columns from Bio-Rad; Rosetta2-(DE3) and pET28b from Novagen, cuvette from Hellma

Protein purification. The vectors expressing NFS1-(amino acid (aa) 59–459), ISD11, ISCU-(aa 36–168) and FXN-(aa 79–207) were kindly provided by Dr. Hélène Puccio (IGBMC, Strasbourg). His-tags followed by thrombin (Thr) cleavage sites were introduced by mutagenesis leading to the expression plasmids pCDFDuet-site1: 6xHis-Thr-NFS1-site2:ISD11, pETDuet-site1: 6xHis-Thr-ISCU and pET16-6xHis-Thr-FXN. The C35S, D37A, C61A, C96S, H103A, and C104S mutations were introduced in ISCU by site-directed mutagenesis (IMAGIF platform, Gif Sur Yvette, France). The vectors expressing human 6xHis-Thr-FDX2 (aa53–183) from pET28b was generated by GenScript (Piscataway, USA). The Rosetta2-(DE3) cells were transformed with the plasmids and the cells were grown from a single colony at 180 rpm at 37 °C in LB with appropriate antibiotics. Protein expression was induced when the cells reached $\text{OD}_{600} = 0.6$ using 500 μM IPTG and the cells incubated for an additional 16 h at 18 °C at 180 rpm for the expression of NFS1-ISD11 and 3 h at 30 °C for the expression of ISCU, FXN, and FDX2. The cell cultures were harvested by centrifugation at 5500 rpm for 10 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in buffer A (50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8) containing a protease inhibitor cocktail. The cell suspensions were lysed by 3 cycles of French Press. Cell debris were removed by centrifugation at 45,000 rpm for 45 min at 4 °C. The His-tagged proteins NFS1-ISD11-ACP, ISCU (WT and mutants), FXN, and FDX2 were purified on a HiTrap chelating HP loaded with nickel ions. The resin was washed with buffer A and bound proteins were eluted by a linear gradient of buffer B (50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8). Protein fractions were mixed and concentrated on Amicon to 4 mL. The His₆-NFS1-ISD11-ACP complex was incubated for 10 min with 10 mM DTT at room temperature to remove persulfide and then loaded on a HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade column pre-equilibrated with buffer P (50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 8). The ISCU (WT and mutants), FXN, and FDX2 proteins were desalted in buffer P on HiPrep Desalting 26/10 and the His-tags were removed by treatment with thrombin (3.5 NIH unit of His6-thrombin per mg of proteins) for 16 h at 22 °C. The ISCU proteins (WT and mutants) were incubated with 10 mM DTT for 10 min to remove persulfide. The cleaved ISCU (WT and mutants), FXN and FDX2 proteins were loaded on a HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade column pre-equilibrated with buffer P. All the proteins were aliquoted and stored in glycerol (10% final) at –80 °C. All these procedures were also previously described¹⁴. For ¹⁵N- labeled and ¹³C-¹⁵N-labeled ISCU, ISCU overexpressing cells were grown in M9 minimal media supplemented with ¹⁵NH₄Cl (1 g L⁻¹), glucose (4 g L⁻¹) or ¹³C-glucose (2.7 g L⁻¹), ampicillin (100 μg mL⁻¹), chloramphenicol (34 μg mL⁻¹), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (50 μM), and ZnCl₂ (50 μM). Purified human FDXR was provided by R. Lill (Marburg). Protein concentrations were determined by UV-visible at 278 nm in urea 8 M, Tris 0.1 M, pH = 7.5 using absorption coefficients of 49965, 9700, 26335, 13850, and 44330 M⁻¹ cm⁻¹ for the NFS1-ISD11-ACP complex, ISCU, FXN, FDX2, and FDXR. The absorption of the PLP ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was also used to double-check the concentration of the NFS1-ISD11-ACP complex.

Metal insertion and exchange. Zn-ISCU was prepared by incubating as-purified ISCU with 2 molar equivalents of ZnSO₄ followed by desalting to remove excess zinc. All iron binding properties on Zn-ISCU and preparation of Fe-ISCU were performed under anaerobic conditions using a Jacomex glove box ($\text{O}_2 < 2 \text{ ppm}$). Samples were prepared by mixing 2 μL of ferrous ammonium sulfate (5 mM) prepared in H₂O with Zn-ISCU (100 μM), with or without FXN (100 μM) in buffer P. To prepare Fe-ISCU, the zinc ion was first removed by incubating Zn-ISCU with DTPA, followed by desalting on Superdex to remove excess DTPA. Then apo-ISCU was incubated with ferrous ammonium sulfate in various conditions as described in each section. Apo-ISCU incubated with one equivalent of ferrous ammonium sulfate is denoted Fe-ISCU thereafter.

Fe-S cluster assembly assays. Fe-S cluster assembly assays were performed under anaerobiosis in two different conditions: catalytic and stoichiometric. Standard catalytic conditions included Zn-ISCU (100 μM) incubated with one molar equivalent of ferrous ammonium sulfate or Fe-ISCU (100 μM), mixed with the NFS1-ISD11-ACP complex (10 μM), FXN (10 μM), FDX2 (10 μM), FDXR (1 μM), and NADPH (200 μM) in buffer P. The mix was transferred into a septum sealed cuvette and the reaction was initiated with L-cysteine (100 μM) introduced with a gastight Hamilton syringe. The kinetics of assembly were monitored by UV-visible spectroscopy at 456 nm. The kinetics of Fe-S cluster assembly with Zn-ISCU at high L-cysteine concentrations were monitored by CD at 430 nm as promiscuous Fe-S clusters were reported to be formed that could contribute to the absorption by UV-visible but not to CD²⁶. Standard stoichiometric conditions included Fe-ISCU (100 μM), the NFS1-ISD11-ACP complex (100 μM), FXN (100 μM), FDX2 (10 μM), FDXR (1 μM), and NADPH (200 μM) in buffer P. The reactions were initiated by L-cysteine (100 μM) as described for catalytic conditions.

To assess the effect of FXN on the reduction of persulfide by FDX2, the reaction of persulfidation of ISCU was performed using stoichiometric amounts of Fe-ISCU

(50 μM) and the NFS1-ISC11-ACP complex (50 μM) with 1 equivalent of L-cysteine for 30 min in buffer P, then FDX2 (5 μM), FDXR (1 μM) and NADPH (100 μM) with or without FXN (50 μM) were added and the reaction of Fe-S cluster assembly was monitored at 456 nm by UV-visible spectroscopy.

UV-visible and CD spectroscopies. Electronic absorption spectra in the UV-visible domain were acquired using a Secomam UVIKON XL spectrometer and CD spectra using a Jasco J-815 CD spectrometer. For iron binding properties of Zn-ISCU, the samples were prepared by mixing 2 μL of ferrous ammonium sulfate (5 mM) prepared in H_2O with Zn-ISCU (100 μM), with or without FXN (100 μM) in buffer P and under anaerobic conditions. For iron binding properties of apo-ISCU, the samples were prepared by mixing apo-ISCU (100 μM), WT and mutants (C35S, D37A, C61S, H103A that are devoid of zinc, and apo-C104S) prepared in buffer P with 2 μL of ferrous ammonium sulfate (5 mM) prepared in water. The mixtures were then introduced in a septum sealed cuvette.

To generate UV-visible and CD spectra of reconstituted ISCU alone and in the NIAUF complex the contribution of the proteins and non-incorporated component was subtracted. To this end, the mixture at the end of the reaction was desalted on a Biospin P6 column to remove the contribution of non-incorporated components, essentially NADPH, and the UV-visible and CD spectra were collected. Then the contribution of the proteins was removed by subtraction of the spectra of the initial mixture (minus L-cysteine and NADPH). To account for protein loss during the desalting procedure, the amount of the initial spectra to be subtracted was calculated based on total protein concentration measured by the Bradford method before and after desalting. Scales in molar absorption coefficients referred to the absorption coefficients of the $[\text{2Fe2S}]$ clusters of free ISCU and of ISCU in the NIAUF complex (see quantifications section).

Quantifications of zinc, iron, and Fe-S clusters. The zinc content of ISCU was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) at IRAMIS, CEA Saclay, France, and routinely by a colorimetric method using 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR), a metallochromic indicator. In brief, a standard curve at 500 nm was prepared using zinc sulfate in the 0–10 μM range in 8 M urea, 150 mM Tris, pH 7.5 containing 100 μM of PAR. The amount of zinc in the proteins was measured in the same buffer for five different concentrations. Iron in proteins was quantified by ICP-MS. Routinely, the concentration of iron in stock solution was determined using ferrozine⁵⁶.

Fe-S clusters were quantified routinely by UV-visible spectroscopy based on absorption coefficients that were determined by quantification of iron by ICP-MS. To determine the absorption coefficient of the $[\text{2Fe2S}]$ cluster of free ISCU and ISCU within the NIAUF complex, ISCU was reconstituted under catalytic and stoichiometric conditions, respectively, with 2 eq. of iron and L-cysteine to reach the maximum yield. For free ISCU, the proteins were separated on a Superdex 75 column under anaerobic conditions. The fractions corresponding to monomeric free ISCU holding a Fe-S cluster were pooled and a UV-visible spectrum was collected. Total iron in this sample was measured by ICP-MS. Based on iron titrations, an absorption coefficient of $7200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ was determined at 456 nm for the $[\text{2Fe2S}]$ of free ISCU. For ISCU in the NIAUF complex, the reaction mixture was desalted on a NAP-5 column, a UV-visible spectrum was collected and total iron was measured by ICP-MS. Since FDX2 was present in this sample which contains a $[\text{2Fe2S}]$ cluster, its contribution to total iron was subtracted based on its initial concentration. But to account for FDX2 loss during the desalting procedure, the initial amount of FDX2 was corrected by measuring total protein concentration by the Bradford method, before and after desalting. The titration of iron, corrected from the contribution from FDX2, yielded an absorption coefficient of $6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 456 nm for the $[\text{2Fe2S}]$ of ISCU in the NIAUF complex.

For titration of Fe-S clusters by iron and L-cysteine, the reconstitutions were performed under catalytic conditions with apo-ISCU (50 μM) mixed with the NFS1-ISC11-ACP complex (5 μM), FXN (5 μM), FDX2 (5 μM), FDXR (1 μM) and NADPH (100 μM) in buffer P and various amounts of iron or L-cysteine as indicated in the text, keeping the concentration of L-cysteine or iron, respectively, constant at 2 molar equivalents.

Mössbauer spectroscopy. Samples for Mössbauer spectroscopy were prepared by mixing 300 μL of apo-ISCU (2 mM) WT and mutants, prepared in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8 (buffer T), with one equivalent of ⁵⁷Fe enriched solution of ferrous ammonium sulfate (81.5 mM) prepared in H_2O . Samples of ISCU reconstituted with a Fe-S cluster were prepared under catalytic conditions with a mixture containing 350 μL of apo-ISCU (1 mM), ⁵⁷Fe enriched ferrous ammonium sulfate (2 mM), the NFS1-ISC11-ACP complex (5 μM), FXN (5 μM), FDX2 (5 μM), FDXR (1 μM), NADPH (2 mM), and L-cysteine (2 mM) in buffer P and after 60 min of reaction the mixture was desalted. The samples were introduced in sample holders and frozen in the glove box.

Transmission Mössbauer spectra were recorded with a conventional Mössbauer spectrometer operated in the constant acceleration mode in conjunction with a 512-channel analyzer in the time-scale mode (WissEl GmbH). The Mössbauer spectra were calibrated using α -iron foil at room temperature. A continuous flow cryostat (Optistat^{DN}, Oxford Instruments) was used to cool the samples to 77 K. Field-dependent conventional Mössbauer spectra were obtained with a helium

closed-cycle cryostat (CRYO Industries of America, Inc.) equipped with a superconducting magnet. The magnetic field was aligned parallel to the γ -ray beam. The spectral data were transferred from the multi-channel analyzer to a PC for further analysis employing the public domain program Vinda running on an Excel 2003[®] platform⁵⁷. The spectra were analyzed by least-squares fits using Lorentzian line shapes with the linewidth Γ . Field-dependent spectra were simulated by means of the spin Hamilton formalism⁵⁸.

Denaturing and native mass spectrometry analysis. Nano-electrospray ionization mass spectrometry (nanoESI-MS) analyses were carried out on a quadrupole time of flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters) equipped with an automated chip-based electrospray ionization technology (Triversa Nanomate, Advion) using the positive ion mode.

Prior to mass spectrometry analysis, the samples were buffer exchanged with 10 mM ammonium acetate (AcONH_4) at pH 7.0 using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 mL, Thermo Scientific).

For denaturing MS analysis, the external calibration was performed using a 2 μM denaturated horse heart myoglobin solution as a standard for denaturing analysis in the 500–5000 m/z range mass spectra. Data acquisition time and scan time were set at 2-min and 4-s, respectively. Buffer exchanged samples were diluted to 10 μM in a mixture of water:acetonitrile (1:1) acidified with 1% of formic acid. Denaturing MS analyses were performed with an accelerating voltage of 40 V and the backing pressure of the instrument was fixed to 1.7 mbar. Mass spectra were deconvoluted with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) using the MaxEnt module 1 with the following parameters: m/z range: 600–3000; Gaussian smoothing: 2; mass range: 14,500–15,000 Da, number of iterations: 30; subtract: 20–40%.

For native mass spectrometry analysis, cesium iodide cluster ions from a 2 g/L isopropanol:water (1:1) solution were used to calibrate the mass spectrometer up to 6000 m/z . Samples were diluted to 10 μM in 10 mM ammonium acetate (AcONH_4) at pH 7.0. Data acquisition time and scan time were set at 2-min and 4-s, respectively. To avoid the dissociation of the iron-sulfur cluster protein interaction, the analysis under native conditions were performed with an accelerating voltage of 40 V and the backing pressure of the instrument was fixed to 6 mbar. Raw data mass spectra were acquired with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) and treated with the following parameters: m/z range: 1500-4000; Gaussian smoothing: 10.

NMR spectroscopy. 1D ¹H and 2D ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC NMR spectra of unlabeled ISCU and ¹⁵N-ISCU were recorded on a Bruker Avance III 800 MHz NMR spectrometer equipped with a TCI cryoprobe at a temperature of 293 K. Samples were in buffer P containing 7% ²H₂O to lock the magnetic field. ISCU concentration was 50–100 μM . Mixed samples with NFS1-ISC11-ACP and FXN were obtained by adding 1 equivalent of each protein and concentrating the mixtures to 50 μM final concentration. Apo-ISCU and Fe-ISCU samples were in buffer T and measured in a valved tube filled in a glove box. Fe-ISCU was prepared by incubating apo-ISCU with one molar equivalent of Fe^{2+} . The ratio of the S to D form was estimated based on the intensities of the two H ϵ -Ne correlation signals of the tryptophan side chain of ISCU (denoted 74 W ϵ)⁴⁹.

Maleimide-peptide alkylation assay. Proteins were assayed for persulfide by alkylation with MalP₁₆¹⁴. The assays were routinely conducted with stoichiometric amounts of NFS1-ISC11-ACP, ISCU (WT and mutants, with and without 1 equivalent of metal) and FXN at a final concentration of 20 μM and 5 equivalents of L-cysteine. The reactions were stopped by incubation with 2 molar equivalents of MalP₁₆ with regard to the total concentration of thiols, under denaturing conditions (2% SDS) for 30 min; then DTT (1 mM) was added and the reactions were incubated for another 30 min before analysis by SDS-PAGE under reducing conditions. Persulfidation of ISCU and NFS1 was monitored on 14% and 10% SDS-PAGE gels, respectively.

Persulfide transfer to Fe-ISCU, Zn-ISCU, apo-ISCU, and the C104S mutant reconstituted with iron (Fe-ISCU^{C104S}) were assayed in the presence of FXN by incubating the proteins with the NIA complex and L-cysteine for 5 min. To assay reduction by FDX2, the persulfidated forms of Fe-ISCU and Zn-ISCU were incubated with FDX2 (20 μM), FDXR (5 μM), and NADPH (100 μM) for 5 min before analysis by the alkylation assay. To circumvent the co-migration of alkylated FDX2 with fully alkylated ISCU which corresponds to its non-persulfidated form, a mutant of ISCU lacking the cysteine residue C96, that is non-conserved, was used to decrease the number of alkylation sites and thereby decrease the size of alkylated ISCU. We have checked that the C96S mutation was silent by assessing the kinetics of Fe-S cluster assembly under catalytic conditions and by comparing the UV-visible spectra with WT ISCU (See Supplementary Fig. 5a, b). To assess the effect of iron on persulfide reduction, the persulfidated form of ISCU prepared as described above was incubated with DTPA (100 μM) for 10 min before adding FDX2 (20 μM), FDXR (5 μM), and NADPH (100 μM). We checked by UV-visible that at this concentration of DTPA the $[\text{2Fe2S}]$ cluster of FDX2 was not destroyed and was still reducible by FDXR and NADPH (See Supplementary Fig. 5c). To assess the parallel effect of FDX2 on the persulfidation of both NFS1 and ISCU (i.e., second transfer or

direct reduction), WT Fe-ISCU (50 μM), the NIA complex (50 μM), and FXN (50 μM) were incubated for 10 min with various amounts of L-cysteine, ranging from sub-stoichiometric to excess, as indicated in the text. Then a mixture containing FDX2 (5 μM), FDXR (1 μM), and NADPH (50 μM) was added and the mixture was incubated for 10 min before analysis by the alkylation assay. The persulfidation of both, ISCU and NFS1, before and after adding FDX2, were analyzed in parallel.

To assess the effect of FXN on the kinetics of persulfide transfer, the reactions were initiated by incubating Zn-ISCU or Fe-ISCU (20 μM) and the NIA complex (20 μM) with 5 equivalents of L-cysteine in the absence or presence of FXN (20 μM). The reactions were analyzed at different time points by adding the mixture containing MalP₁₆ and SDS, as described above, to quench the reaction. Then the persulfidation of ISCU was analyzed as described above.

Simulation of kinetics. The kinetics were fitted using the enzyme-substrate model developed by Michaelis and Menten.

For catalytic conditions of reconstitution, the quasi-stationary state approximation as developed by Briggs and Haldane was applied to the linear portion of the kinetics corresponding to the steady state conditions. In this model the initial and maximum velocities, V_i and V_{\max} , are expressed as follows:

$$V_i = \frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_M} \quad (1)$$

$$V_{\max} = k_2 \cdot [E_0] \quad (2)$$

Where P is the concentration of product, $[S_0]$ and $[E_0]$ are the initial concentrations of substrate and enzyme, respectively, K_M is the Michaelis constant and k_2 the rate of product formation. As the initial velocities were constant at all concentrations of L-cysteine tested (Supplementary Fig. 2b), this indicated that the rate of the reaction was at its maximum velocity. The initial velocity could then be equal to the maximum velocity:

$$V_i = V_{\max} = k_2 \cdot [E_0] \quad (3)$$

and after integration, the concentration of product is:

$$[P] = k_2 \cdot [E_0] \cdot t \quad (4)$$

The rate constant of Fe-S assembly, k_2 , was extracted from the slope by linear regression of the linear portion of the curve. A similar model was applied to extract the rate constant of persulfide reduction by FDX2 by monitoring Fe-S cluster formation upon addition of FDX2 to the persulfidated form of the NIAU complex.

For stoichiometric conditions of reconstitution, the kinetics of persulfide transfer were modelled as a first-order reaction corresponding to the trans-persulfidation reaction within the NIAU complex. The curves were fitted using the following first-order equation:

$$P = P_f(1 - \exp(-k \cdot t)) \quad (5)$$

Where P_f is the final concentration of product and k the rate constant of persulfide transfer.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The source data underlying Figs. 1a, d, 2e, f, 3a, b, g–i, 4a, b, f are provided as a Source Data file. All other data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 14 February 2019 Accepted: 4 July 2019

Published online: 08 August 2019

References

- Braymer, J. J. & Lill, R. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **292**, 12754–12763 (2017).
- Cardenas-Rodriguez, M., Chatzi, A. & Tokatlidis, K. Iron-sulfur clusters: from metals through mitochondria biogenesis to disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 509–520 (2018).
- Ciofi-Baffoni, S., Nasta, V. & Banci, L. Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics* **10**, 49–72 (2018).
- Rouault, T. A. & Maio, N. Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* **292**, 12744–12753 (2017).
- Freibert, S. A. et al. Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nat. Commun.* **8**, 13932 (2017).
- Roche, B. et al. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 455–469 (2013).
- Alvarez, S. W. et al. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis. *Nature* **551**, 639 (2017).
- Ezraty, B. et al. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science* **340**, 1583 (2013).
- Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: a protein in search for a function. *J. Neurol.* **126**(Suppl 1), 43–52 (2013).
- Stehling, O., Wilbrecht, C. & Lill, R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* **100**, 61–77 (2014).
- Saxena, N., et al. SDHB-deficient cancers: the role of mutations that impair iron sulfur cluster delivery. *J. Natl Cancer I.* **108**, djv287 (2016).
- Fuss, J. O., Tsai, C. L., Ishida, J. P. & Tainer, J. A. Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1253–1271 (2015).
- Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J. & Rouhier, N. Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 545–566 (2018).
- Parent, A. et al. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat. Commun.* **6**, 5686 (2015).
- Adinolfi, S. et al. Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 390–396 (2009).
- Agar, J. N. et al. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**, 7856–7862 (2000).
- Chandramouli, K. et al. Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **46**, 6804–6811 (2007).
- Colin, F. et al. Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 733–740 (2013).
- Nuth, M., Yoon, T. & Cowan, J. A. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]²⁺ cluster core in IscU proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8774–8775 (2002).
- Tsai, C. L. & Barondeau, D. P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132–9139 (2010).
- Webert, H. et al. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* **5**, 5013 (2014).
- Smith, A. D. et al. Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11103–11104 (2001).
- Urbina, H. D., Silberg, J. J., Hoff, K. G. & Vickery, L. E. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 44521–44526 (2001).
- Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C. L., Winn, A. M. & Barondeau, D. P. Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* **53**, 4904–4913 (2014).
- Beilschmidt, L. K. et al. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nat. Commun.* **8**, 15124 (2017).
- Fox, N. G., Chakrabarti, M., McCormick, S. P., Lindahl, P. A. & Barondeau, D. P. The human iron-sulfur assembly complex catalyzes the synthesis of [2Fe-2S] clusters on ISCU2 that can be transferred to acceptor molecules. *Biochemistry* **54**, 3871–3879 (2015).
- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J. & Lill, R. Specialized function of Yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 41205–41216 (2011).
- Synofzik, M. & Németh, A. H. in *Handbook of Clinical Neurology 155* (eds Mario Manto & Thierry A. G. M. Huisman) 73–89 (Elsevier, 2018).
- Seguin, A. et al. Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802**, 531–538 (2010).
- Martelli, A. & Puccio, H. Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Front. Pharmacol.* **5**, 130 (2014).
- Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. & Craig, E. A. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* **5**, 1096–1101 (2004).
- Iannuzzi, C. et al. The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the E. coli IscU scaffold protein. *PLoS one* **6**, e21992 (2011).
- Pandey, A. et al. Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J. Biol. Chem.* **288**, 36773–36786 (2013).
- Pynyaha, Y. V. et al. Deficiency in frataxin homologue YFH1 in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to missregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation. *Biometals* **22**, 1051–1061 (2009).
- Yoon, H. et al. Frataxin-bypassing Isu1: characterization of the bypass activity in cells and mitochondria. *Biochem. J.* **459**, 71–81 (2014).

36. Roche, B., Huguenot, A., Barras, F. & Py, B. The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Micro* **95**, 605–623 (2015).
37. Dzul, S. P. et al. In vitro characterization of a novel Isu homologue from *Drosophila melanogaster* for de novo FeS-cluster formation. *Metalomics* **9**, 48–60 (2017).
38. Rodrigues, A. V., Kandegedara, A., Rotondo, J. A., Dancis, A. & Stemmler, T. L. Iron loading site on the Fe-S cluster assembly scaffold protein is distinct from the active site. *Biomaterials* **28**, 567–576 (2015).
39. Adinolfi, S. et al. Bacterial IscU is a well folded and functional single domain protein. *Eur. J. Biochem* **271**, 2093–2100 (2004).
40. Ramelot, T. A. et al. Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site. *J. Mol. Biol.* **344**, 567–583 (2004).
41. Liu, J. et al. Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form. *Proteins* **59**, 875–881 (2005).
42. Iannuzzi, C. et al. The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein. *Protein Sci.* **23**, 1208–1219 (2014).
43. Boniecki, M. T., Freiberg, S. A., Muhlenhoff, U., Lill, R. & Cygler, M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* **8**, 1287 (2017).
44. Cory, S. A. et al. Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISC11 interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E5325–E5334 (2017).
45. Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D. & Vickery, L. E. Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange. *Biochemistry* **50**, 9641–9650 (2011).
46. Fox, N. G. et al. Zinc(II) binding on human wild-type ISCU and Met140 variants modulates NFS1 desulfurase activity. *Biochimie* **152**, 211–218 (2018).
47. McLaughlin, M. P. et al. Azurin as a Protein Scaffold for a Low-coordinate Nonheme Iron Site with a Small-molecule Binding Pocket. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 19746–19757 (2012).
48. Tucker, N. P. et al. Analysis of the nitric oxide-sensing non-heme iron center in the NorR regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 908–918 (2008).
49. Kim, J. H. et al. Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry* **48**, 6062–6071 (2009).
50. Liu, J. et al. Redesigning the blue copper azurin into a redox-active mononuclear nonheme iron protein: preparation and study of Fe(II)-M121E Azurin. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12337–12344 (2014).
51. Marinoni, E. N. et al. (IscS-IscU)2 complex structures provide insights into Fe2S2 biogenesis and transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5439–5442 (2012).
52. Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **383**, 133–143 (2008).
53. Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. & Lill, R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 1050–1055 (2000).
54. Sheftel, A. D. et al. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 11775–11780 (2010).
55. Selbach, B. P. et al. Fe-S cluster biogenesis in Gram-Positive bacteria: SufU is a zinc-dependent sulfur transfer protein. *Biochemistry* **53**, 152–160 (2014).
56. Martin, D. et al. The rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA. *FASEB J.* **27**, 1074–1083 (2013).
57. Gunnelagsson, H. P. Spreadsheet based analysis of Mössbauer spectra. *Hyperfine Interact.* **237**, 1–6 (2016).
58. Volker, S. & Heiner, W. Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy. *Rep. Prog. Phys.* **63**, 263 (2000).

Acknowledgements

We are grateful to M. Tummeley for support during the record of the Mössbauer spectra and Batoul Srour for help with CD recording. We are grateful to Roland Lill's lab for providing purified ferredoxin reductase. This work was funded by the french National

Research Agency (ANR-17-CE11-0021 Frataxur awarded to B. D'Autréaux, ANR AA17-PPPPCE11-0000034-02 PrxAge to M.B. Tolédano and ANR-11-LABX-0011-01 "LABEX DYNAMO"), Fondation pour la Recherche Medicale to M.B. Tolédano, the MINECO (grants CTQ2014-52658-R and CTQ2017-84779-R) for peptide-maleimide synthesis, the Université de Strasbourg and the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03) for mass spectrometry experiments. S.C. thanks GIS IBISA and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2 HDMS instrument. T.B. acknowledges the Institut de Recherche Servier for funding of his PhD fellowship. C.S.M. and V.S. acknowledge the DFG for financial support of this work (SCHU 1251/17-1 within the SPP 1927 "Iron-Sulfur for Life").

Author contributions

S.G. made characterization of iron containing ISCU by CD, Mössbauer and NMR, assessed efficiency of Fe-ISCU and Zn-ISCU in Fe-S cluster reconstitution assays and characterized Fe-S reconstituted ISCU by native mass spectrometry and Mössbauer. He also made L-cysteine titrations of persulfidation and reduction by FDX2 using alkylation assays. D.L. assessed the effects of FDX2 on the persulfide of Fe-ISCU and Zn-ISCU by alkylation assays and mass spectrometry, performed kinetics of persulfide transfer to Fe-ISCU and Zn-ISCU and assessed the effects of FXN on transfer. A.B.M. contributed first studies showing effect of zinc and iron in ISCU using kinetics and alkylation assays and first experiments indicating the effects of FXN on persulfide transfer. T.B. performed all the analysis by mass spectrometry and contributed interpretation of the data. C.S.M. performed all Mössbauer characterizations and simulations of these data and contributed interpretation of the results. L.P. contributed metal titrations and analysis of oligomeric states of Fe-S cluster containing ISCU. G.L.P. performed site-directed mutagenesis on ISCU. A.D.-M. contributed discussion of the results. O.B., J.A., and A.G. synthesized the maleimide-peptide. M.F. contributed interpretation of the results. V.S. contributed interpretation of Mössbauer analysis. S.C. contributed design and interpretation of the mass spectrometry experiments. C.S. designed and performed NMR analysis as well as interpretations. M.T. contributed discussion of the results and writing of the manuscript. B.D'A. designed and contributed most of the experiments, supervised S.G., D.L., A.B.M., and G.L.P., analyzed and interpreted the results and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Peer Review Information: *Nature Communications* thanks Patricia Dos Santos, Tracey Rouault and the other anonymous reviewer for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

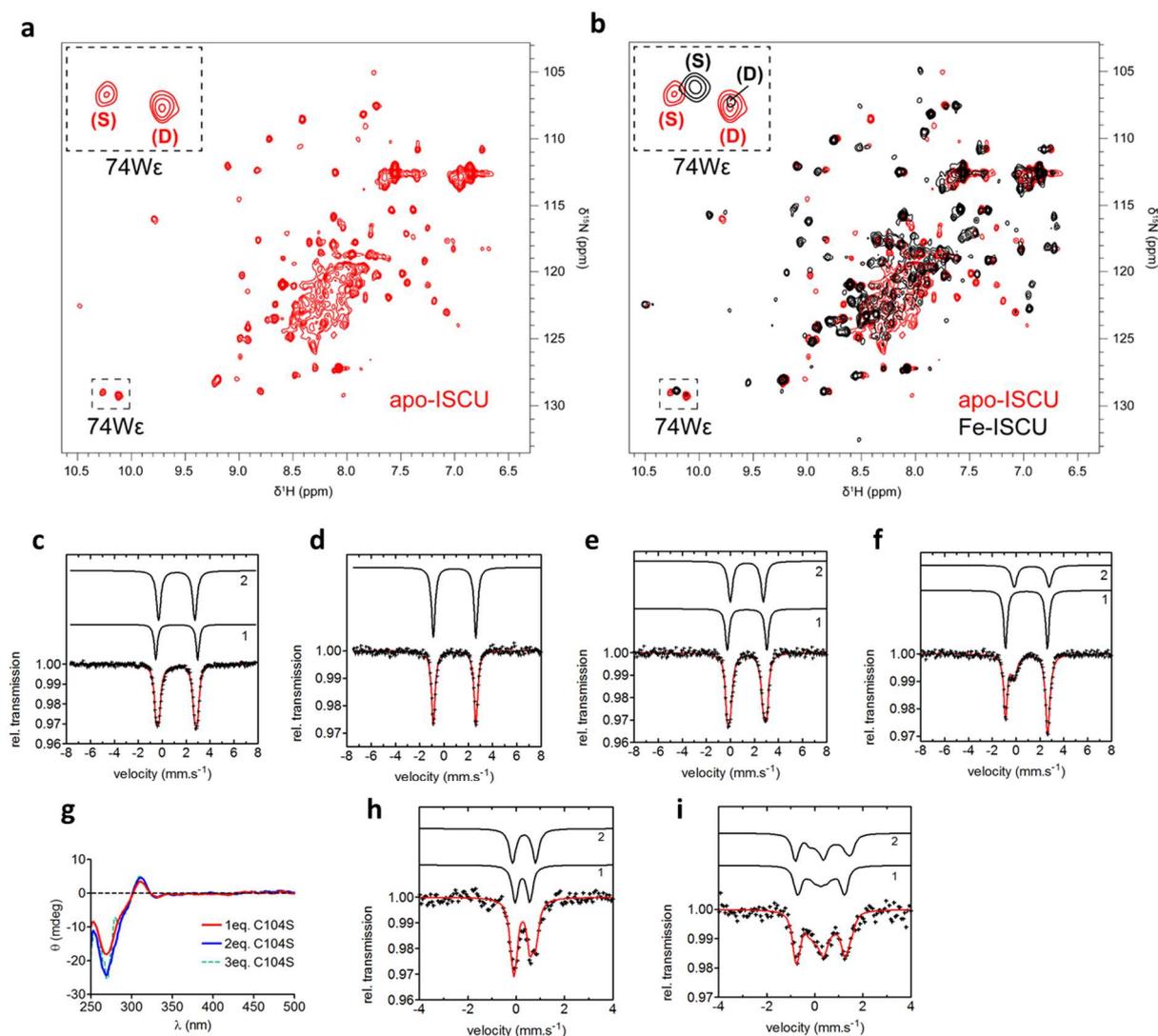
© The Author(s) 2019

Supplementary Information

Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin

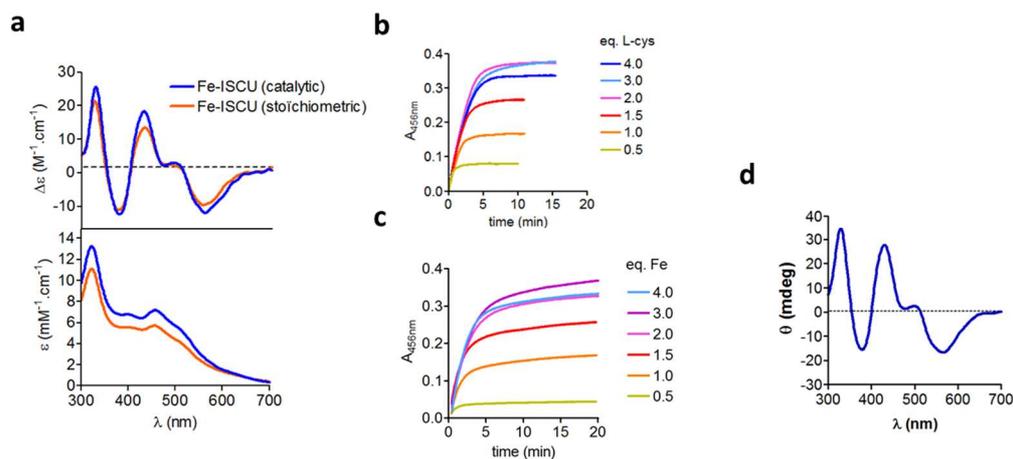
Gervason, Larkem, Ben Mansour *et al.*

Supplementary Figures



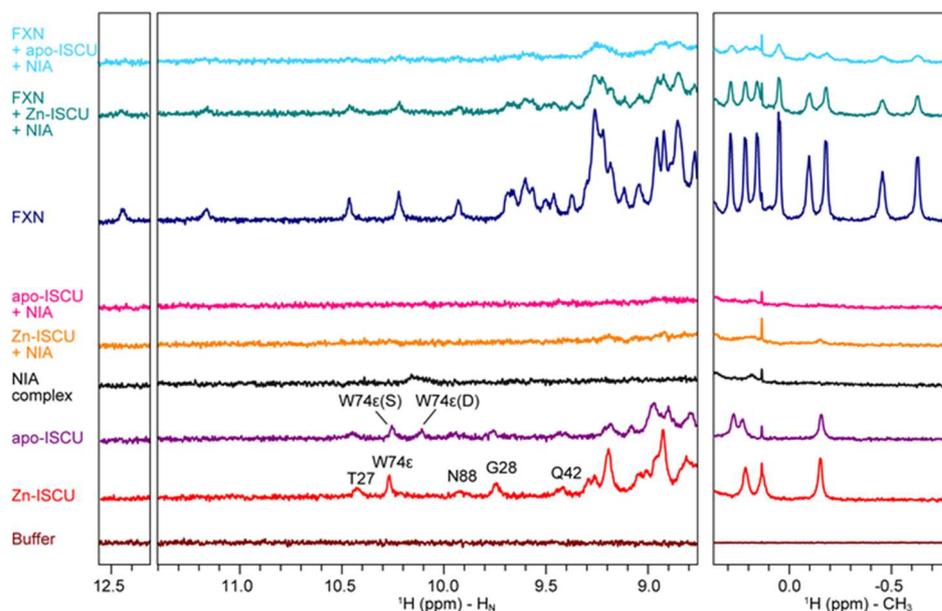
Supplementary Figure 1: Characterization of Fe-ISCU and its Fe-S reconstituted form

(a, b) ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC NMR spectra of apo-ISCU (100 μM) in red (a, b) and apo-ISCU incubated with one equivalent of iron in black (b). The insets show close-ups of the W74 He-N ϵ signals assigned to structured (S) and disordered (D) conformations. Spectra were acquired at 293 K and 800 MHz ^1H resonance frequency. (c) Mössbauer spectrum of ferrous iron in buffer T. (d) Mössbauer spectrum of ISCUC WT incubated with 0.6 equivalent of iron. (e-f) Mössbauer spectra of the ISCUC mutants H103A (e) and C104S (f) incubated with one equivalent of iron. (g) Titration of iron by the C104S mutant monitored by CD. Increasing amounts of the C104S mutant (100, 200 and 300 μM) were incubated with a fixed concentration of iron (100 μM). At 300 μM the protein starts to precipitate which precludes to complete the titration. (h,i) Applied field Mössbauer spectra of Fe-ISCUC reconstituted with a Fe-S cluster. The spectra were recorded at $T = 4.2$ K in an external field $B = 0.1$ T (h) and $B = 5$ T (i). The red solid line represents the best fits of the data achieved using the components displayed as black solid lines. (See **Supplementary Table 1** for the respective parameters of each component).



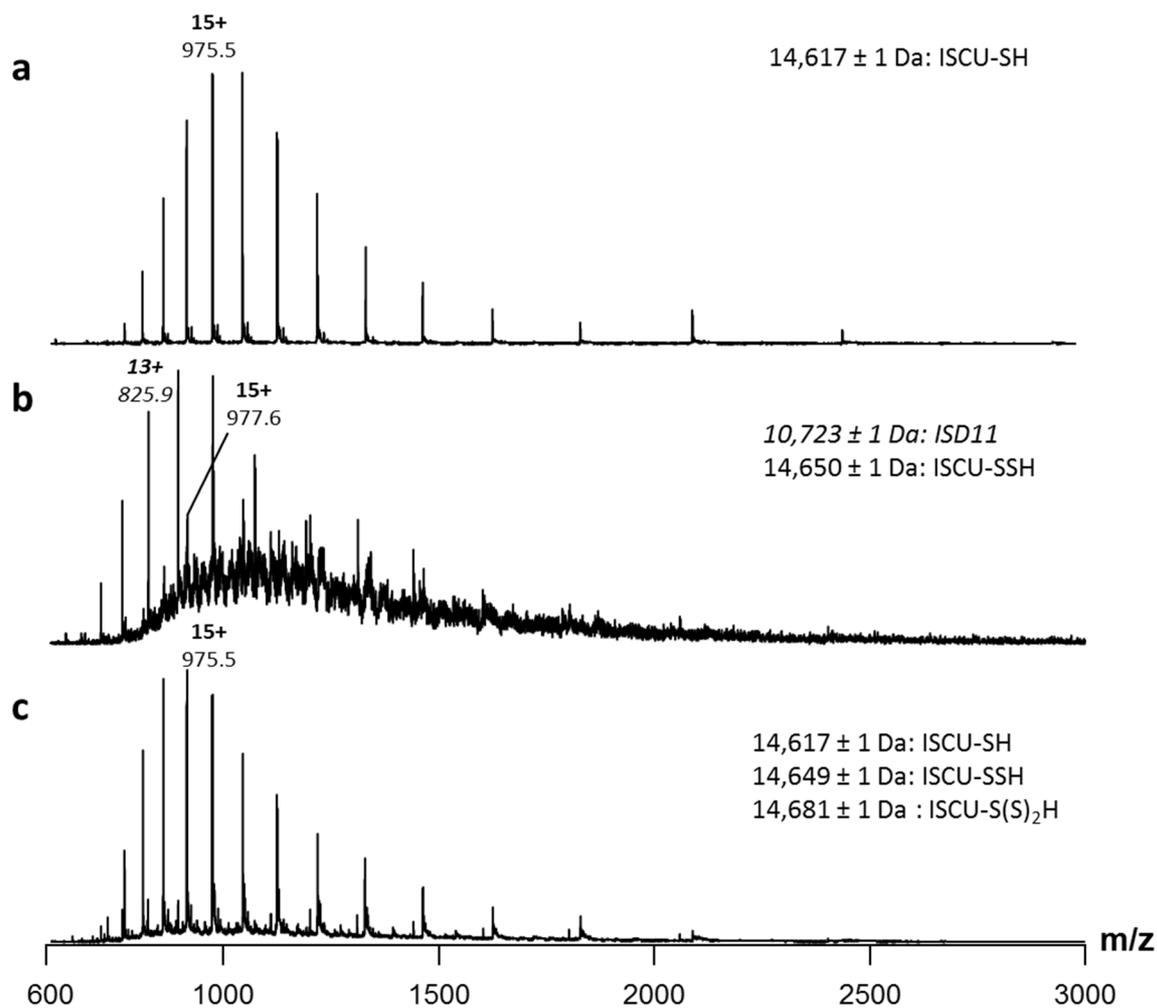
Supplementary Figure 2: Characterization of Fe-S cluster formation in the NIAUF complex and iron and L-cysteine titrations

(a) UV-visible and CD spectra of ISCU reconstituted under catalytic (free ISCU) and stoichiometric (ISCU in the NIAUF complex) conditions. The spectra are displayed in molar absorption units based on the absorption coefficients of the $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ in free ISCU and in the NIAUF complex. (b) Fe-S cluster reconstitution assays under catalytic conditions at various concentrations of L-cysteine as indicated in molar equivalents with regard to ISCU and using 2 equivalents of iron. (c) Fe-S cluster reconstitution assays under catalytic conditions at various concentrations of iron as indicated in molar equivalents as regards to ISCU and using 2 equivalents of L-cysteine. (d) CD spectrum of Fe-S cluster reconstitution by Fe-ISCU performed under catalytic conditions in the absence of FXN, with one equivalent of L-cysteine.



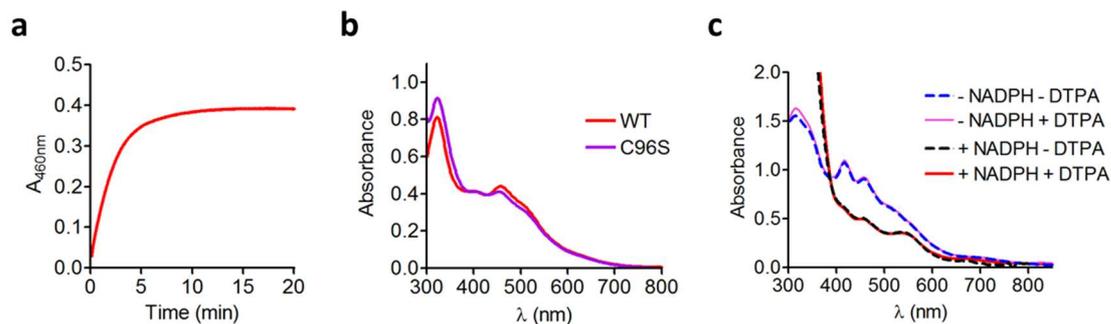
Supplementary Figure 3: Formation of the NIAUF complex with apo-ISCU

^1H NMR spectra excerpts zoomed in the amide (H_N) (left and middle panel) and methyl (CH_3) (right panel) regions of Zn-ISCU, apo-ISCU, the NIA complex and FXN, and mixtures of NIA complex with Zn-ISCU or apo-ISCU in a 1:1 molar ratio, FXN with NIA complex and Zn-ISCU, or NIA complex and apo-ISCU, in a 1:1:1 ratio. Intensities in the methyl region were scaled down relative to the amide region. Spectra were acquired at a temperature of 293 K and at 800 MHz ^1H resonance frequency. The assignments of the two signals from W74- H_ϵ in apo-ISCU corresponding to the S and D conformational states are indicated as well as those of ISCU amide signals with $\delta^1\text{H} > 9.4$ ppm.



Supplementary Figure 4: Raw mass spectra of persulfidation states of ISCU

Raw mass spectra corresponding to the deconvoluted spectra of (a) Fig. 3c, (b) Fig. 3d and (c) Fig. 3e. See **Table 3** for the theoretical and experimental masses.



Supplementary Figure 5: Properties of the C96S ISCU mutant and effect of DTPA on FDX2

(a) Kinetic of Fe-S cluster assembly under catalytic conditions with the C96S mutant of ISCU. (b) UV-visible spectrum of Fe-S cluster reconstituted C96S ISCU as performed in (a). (c) UV-visible spectra of mixture containing oxidized FDX2 and FDXR incubated with (pink line) and without (dashed blue line) DTPA and upon addition of NADPH in reactions missing (dashed black line) and containing (red line) DTPA. DTPA does not alter the UV-visible spectrum of FDX2, indicating that it is not able to chelate the iron of the [2Fe₂S] cluster of FDX2. Upon addition of NADPH, the spectrum of FDX2 is modified in the same way both in the absence and presence of DTPA, which indicates that the [2Fe₂S] cluster is reduced by FDXR and that DTPA does not interfere with this reaction.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1: Mössbauer parameters of samples from this study

Sample	Eq. Fe	T (K)	B (T)	component	Area (%)	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Γ (mm/s)	η (mm/s)
WT ISCU	1	77	0	1	85	0.89	3.51	0.32	
				2	15	1.12	2.77	0.6	
Fe	-	77	0	1	34	1.22	3.5	0.31	
				2	66	1.22	3.03	0.43	
WT ISCU	0.6	77	0	1	100	0.88	3.51	0.35	
H103A ISCU	1	77	0	1	52	1.23	3.43	0.40	
				2	48	1.23	2.84	0.45	
C104S ISCU	1	77	0	1	63	0.87	3.51	0.35	
				2	37	1.23	3.15	0.65	
Fe-S reconstituted WT ISCU		77	0	1	50	0.26	0.61	0.28	
				2	50	0.33	0.95	0.34	
		4.2	0.1	1	50	0.26	0.61	0.29	1 (-0.3)
				2	50	0.33	0.95	0.31	0 (+0.3)
		4.2	5	1	50	0.26	0.61	0.29	1 (-0.3)
				2	50	0.33	0.95	0.31	0 (+0.3)

Supplementary Table 2: Selected Mössbauer parameters of ferrous iron center in proteins with various combinations of O, N and S coordinating atoms

Proteins	Environment	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	reference
<i>Mus musculus</i> ISCU		0.89	3.51	this work
<i>D. desulfuricans</i> SOR center I (Desulfoferrodoxin)	4S	0.66	2.90	1
<i>C. pasteurianum</i> Rubredoxin	4S	0.70	- 3.25	2
<i>C. pasteurianum</i> Rubredoxin C42S	3S, 1O	0.79	2.95 - 3.27	3
Horse Alcohol Dehydrogenase	2S, 1N, 1N/O	0.83	3.84	4
<i>P. aeruginosa</i> Azurin	1S, 2N, 1O	0.92	3.19	5
<i>D. desulfuricans</i> SOR center II (Desulfoferrodoxin)	1S, 4N	1.04	2.87	6
Soybean Lipoxygenase	3N, 2O	1.10	3.08	7
<i>E. coli</i> FUR site 2	3N, 2O	1.19	3.47	8
<i>H. sapiens</i> Tyrosine Hydroxylase 1	6N/O	1.24	2.68	9

Supplementary Table 3: List of theoretical and experimental masses of ISCU persulfidation states determined from spectra presented in **Fig. 3c-e** and **Supplementary Fig. 4**.

Species	Theoretical mass (Da)	Experimental mass (Da)	Error (ppm)
ISCU-SH	14,618	14,617 ± 1	68
ISCU-SSH	14,650	14,650 ± 1	-
ISCU-S(S) ₂ H	14,682	14,681 ± 1	68

Supplementary Notes

Supplementary Note 1: Mössbauer analysis of WT, C104S and H103A ISCU proteins incubated with iron

Mössbauer spectroscopy provides direct information on the nature of the atoms coordinating an iron ion. There is a linear correlation between the gain in isomer shift and the number of electronegative ligands coordinating the iron center: the more electronegative the ligand, the higher the isomer shift.¹⁰ Fe(II) centers in proteins with 4 sulfur ligands typically exhibit an isomer shift in the range of 0.60 – 0.70 mm.s⁻¹. Adding more electronegative ligands such as nitrogen and oxygen ligands leads to an increase of the isomer shift with values higher than 1.2 mm.s⁻¹ for Fe(II) centers with six oxygen and nitrogen and no sulfur coordination (see **Supplementary Table 2** for selected Fe(II) centers).

Based on these empiric correlations, the isomer shifts of component 1 and 2 in the sample of WT ISCU are both consistent with high spin Fe(II) centers in mixed environments but with one or two sulfur ligands and two or three N/O ligands for component 1 and five or six N/O atoms but no sulfur for component 2 (**Supplementary Table 1 and 2**). The proportions of two components detected by Mössbauer appear correlated with those of the S and D states.

The Mössbauer spectrum of the H103A mutant reveals the presence of two components with parameters similar to those of free iron (**Supplementary Fig. 1e** and **Supplementary Table 1**). This indicates that the H103A mutation precludes iron binding in the cysteinyl site, leaving iron free or promiscuously bound to ISCU. Interestingly the minor species identified in WT ISCU (component 2) does not seem to be present in H103A mutant, this suggests that H103 may be a ligand in component 2.

The C104S mutant incubated with 1 equivalent of iron reveals the presence of two components. A major species (65 %) with Mössbauer parameters identical to those of iron in the assembly site of the WT protein and a minor component (45 %) with parameters similar to those of free iron (**Supplementary Fig. 1f** and **Supplementary Table 1**). The lower proportion of iron in the assembly site compared to WT ISCU suggests that either a proportion of the C104S mutant is compromised for iron binding or that the C104S mutation lowers the affinity of iron for the assembly site. By increasing the ratio of the C104S mutant over iron, keeping the concentration of iron constant, we found that the CD signal increases reaching similar intensity as the WT (**Supplementary Fig. 1g**). This indicates that the C104S

mutant has lower affinity for iron than WT. The absence of the minor species detected in WT ISCU (component 2) suggests that C104 is also required for binding of iron to the D state of apo-ISCU, although not ligating the iron.

Supplementary Note 2: Analysis of Mössbauer data of Fe-S reconstituted ISCU

The best fit of the Mössbauer data was obtained with two components in a 50:50 ratio. The values of the isomer shifts are in the range of 0.25 to 0.35 mm.s⁻¹ which is characteristic of oxidized iron in a [2Fe2S]²⁺ cluster (**Fig. 2c, Supplementary Fig. 1h, 1i and Supplementary Table 1**). The 50:50 ratio of components 1 and 2 further support the presence of a dinuclear center. The presence of [4Fe4S] clusters can be excluded based on the isomer shifts, since values in the range of 0.4 to 0.9 mm.s⁻¹ are expected for a [4Fe4S] cluster.¹¹ Moreover, the best fits of the field dependent Mössbauer spectra were achieved by considering that the Fe-S cluster is diamagnetic species.¹¹ This indicates that the resulting spin state of the [2Fe2S] cluster is S = 0 which is consistent with two antiferromagnetically coupled Fe³⁺ ions and thus confirms that the [2Fe2S] cluster is in its oxidized state with an overall +2 charge. Moreover, the iron ions in the [2Fe2S]²⁺ cluster are not equivalent, they exhibit different set of parameters which point to different environments. The isomer shifts suggest that the Fe³⁺ ion in site 1 is coordinated by four sulfur atoms and the iron in site 2 by two or three sulfurs and one or two N/O ligand(s).^{11,12}

Supplementary Note 3: Formation of complexes with apo-ISCU

The 1D ¹H NMR spectra of apo-ISCU and Zn-ISCU show a complete disappearance of resonances upon mixing with one molar equivalent of the NIA complex (see **Supplementary Fig. 3**). As the size of a protein increases, its rotational motion in solution is slowed down and the NMR signals widths increase. The signals of the large NIA complex are broad to such a point that they become nearly undetectable. The apparent disappearance of the signals of ISCU in the presence of the NIA complex is attributed to complete broadening of the signals and thus provides evidence for complex formation.

Upon mixing FXN with the NIAU complex containing either apo-ISCU or Zn-ISCU, the characteristic peaks of FXN are strongly diminished which points to association of FXN to the NIAU complex. However, as the peaks do not totally disappear, some free FXN remains. At a 1:1 molar ratio, ~ 10 % and 35 % of free FXN signals are still observed for the complexes formed with apo-ISCU and Zn-ISCU, respectively. This points to affinities of

FXN in the micromolar range for both complexes and a higher affinity for the complex containing apo-ISCU.

Supplementary References

- 1 Tavares, P., Ravi, N., Moura, J. J. G., Legall, J., Huang, Y. H., Crouse, B. R., Johnson, M. K., Huynh, B. H., Moura, I. Spectroscopic Properties of Desulfoferrodoxin from Desulfovibrio-Desulfuricans (Atcc-27774). *Journal of Biological Chemistry* (1994) **269**, 10504-10510
- 2 Phillips, W. D., Poe, M., Weiher, J. F., McDonald, C. C., Lovenberg, W. Proton Magnetic Resonance, Magnetic Susceptibility and Mossbauer Studies of Clostridium-Pasteurianum Rubredoxin. *Nature* (1970) **227**, 574-+
- 3 Yoo, S. J., Meyer, J., Achim, C., Peterson, J., Hendrich, M. P., Munck, E. Mossbauer, EPR, and MCD studies of the C9S and C42S variants of Clostridium pasteurianum rubredoxin and MCD studies of the wild-type protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2000) **5**, 475-487
- 4 Bill, E., Haas, C., Ding, X. Q., Maret, W., Winkler, H., Trautwein, A. X., Zeppezauer, M. Fe(II)-Substituted Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase, a Model for Non-Heme Iron Enzymes - Various States of Iron-Dioxygen Interaction Investigated by Mossbauer and Epr Spectroscopy. *Eur J Biochem* (1989) **180**, 111-121
- 5 McLaughlin, M. P., Retegan, M., Bill, E., Payne, T. M., Shafaat, H. S., Pena, S., Sudhamsu, J., Ensign, A. A., Crane, B. R., Neese, F., Holland, P. L. Azurin as a Protein Scaffold for a Low-coordinate Nonheme Iron Site with a Small-molecule Binding Pocket. *Journal of the American Chemical Society* (2012) **134**, 19746-19757
- 6 Moura, I., Tavares, P., Moura, J. J. G., Ravi, N., Huynh, B. H., Liu, M. Y., Legall, J. Purification and Characterization of Desulfoferrodoxin - a Novel Protein from Desulfovibrio-Desulfuricans (Atcc-27774) and from Desulfovibrio-Vulgaris (Strain Hildenborough) That Contains a Distorted Rubredoxin Center and a Mononuclear Ferrous Center. *Journal of Biological Chemistry* (1990) **265**, 21596-21602
- 7 Dunham, W. R., Carroll, R. T., Thompson, J. F., Sands, R. H., Funk, M. O. The Initial Characterization of the Iron Environment in Lipoyxygenase by Mossbauer-Spectroscopy. *Eur J Biochem* (1990) **190**, 611-617
- 8 Jacquamet, L., Dole, F., Jeandey, C., Oddou, J. L., Perret, E., Le Pape, L., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Michaud-Soret, I., Latour, J. M. First spectroscopic characterization of Fe-II-Fur, the physiological active form of the Fur protein. *Journal of the American Chemical Society* (2000) **122**, 394-395
- 9 Schunemann, V., Meier, C., Meyer-Klaucke, W., Winkler, H., Trautwein, A. X., Knappskog, P. M., Toska, K., Haavik, J. Iron coordination geometry in full-length, truncated, and dehydrated forms of human tyrosine hydroxylase studied by Mossbauer and X-ray absorption spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (1999) **4**, 223-231
- 10 Gütlich, P., Bill, E., Trautwein, A. X. *Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry. Fundamentals and Applications*. 2 edn, (Springer-Verlag, 2011).
- 11 Pandelia, M. E., Lanz, N. D., Booker, S. J., Krebs, C. Mossbauer spectroscopy of Fe/S proteins. *Bba-Mol Cell Res* (2015) **1853**, 1395-1405
- 12 Garcia-Serres, R., Clémancey, M., Latour, J.-M., Blondin, G. Contribution of Mössbauer spectroscopy to the investigation of Fe/S biogenesis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2018) **23**, 635-644

1.3 Résumé de l'article #2

1.3.1 Caractérisation du site de fixation du fer d'ISCU

Nous avons dans un premier temps mesuré la quantité de zinc dans la protéine ISCU purifiée. Nous avons trouvé entre 0,7 et 0,8 atome de zinc par ISCU et la possibilité de reconstituée la protéine avec 1 atome de zinc en l'incubant avec du sulfate de zinc. La protéine ainsi reconstituée sera appelée Zn-ISCO par la suite. Nous avons alors testé la fixation du fer dans le site d'assemblage d'ISCO avec les protéines Zn-ISCO et apo-ISCO. Le site d'assemblage contenant des cystéines, nous avons utilisé le dichroïsme circulaire (CD) qui permet de détecter des transitions de transfert de charge entre des ligands cystéine et un atome de fer (cystéine \rightarrow Fe²⁺) qui sont attendues entre 200 et 350 nm (**Figure 1b article#2**) (McLaughlin & al, 2012 ; Tucker & al, 2008). Lorsque la protéine Zn-ISCO est incubée avec des ions Fe²⁺, aucune bande d'absorption spécifique de l'insertion du fer dans le site métallique n'est obtenu, même lorsque la frataxine est présente (**Figure 42, réaction 2 et 3**). Cependant, lorsque apo-ISCO est incubée avec des ions Fe²⁺, des bandes d'absorptions à 270, 310 et 340 nm caractéristiques de la liaison cystéine \rightarrow Fe²⁺ apparaissent. Ces données montrent que la présence de zinc dans le site métallique de la protéine empêche la fixation du fer. De plus, dans ces conditions la frataxine est incapable de fournir les ions Fe²⁺ à Zn-ISCO et n'est pas non plus nécessaire à l'insertion du fer dans apo-ISCO, ce qui suggère qu'il s'agit d'un processus passif ne nécessitant pas de métallochaperone (**Figure 42, réaction 1**).

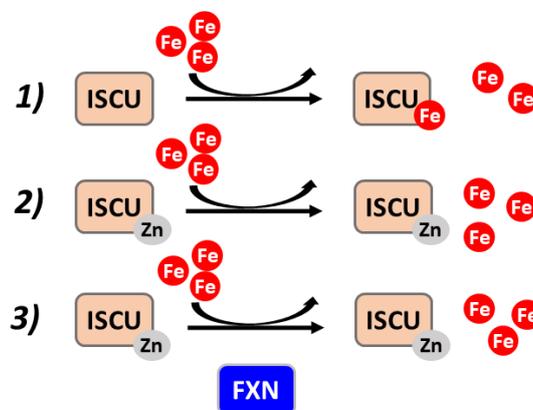


Figure 42 Insertion du fer dans apoISCO ou Zn-ISCO. (1) L'insertion de fer est passive lorsque apoISCO est incubée avec des ions Fe²⁺. (2-3) La forme Zn-ISCO n'est pas capable de lier du fer dans le site métallique d'ISCO même en présence de FXN.

La titration en fer dans ISCU a montré qu'un seul atome de fer est présent dans le site métallique (**Figure 1c article#2**). Nous avons également réalisé une étude par spectroscopie Mössbauer qui permet de voir l'ensemble du fer, pas uniquement le fer lié aux résidus cystéines. Les deux paramètres obtenus par spectroscopie Mössbauer sont le déplacement isomérique δ qui est sensible à la nature des ligands,

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

la valeur de δ diminuant lorsque le nombre de cystéines augmente, et l'écart quadrupolaire, Δ_{Eq} , qui est sensible à la géométrie du site. Lorsque la protéine apo-ISCU est incubée avec 0.7 équivalent de Fe^{2+} , une seule espèce est détectée qui est caractérisée par un déplacement isomérique de $0,89 \text{ mm.s}^{-1}$ (**Figure supplémentaire 1d article#2**). Par comparaison avec d'autres site à fer, cette valeur est compatible avec un centre Fe(II) haut-spin ($S = 2$) dans un environnement contenant 1 à 3 ligands cystéines, pouvant donc correspondre au site d'assemblage. Cependant, lorsque la protéine est incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} , une seconde espèce, minoritaire (15 %), apparaît avec un déplacement isomérique de $1,12 \text{ mm.s}^{-1}$ correspondant à du fer dans un environnement contenant uniquement des ligands oxygènes ou azotes, pouvant correspondre soit à du fer lié non spécifiquement à la protéine soit à du fer « libre » lié au tampon (**Figure 1e article#2**). Nous avons également montré par RMN que l'incubation d'ISCU avec 1 équivalent de fer permet la structuration de la majorité de la protéine (80 %), avec 20 % restant sous forme déstructurée (**Figure supplémentaire 1b article#2**). Nous avons ainsi corrélié la présence de cette forme déstructurée au 15 % de fer détecté par spectroscopie Mössbauer qui ne se lie pas dans le site contenant des cystéines. Il semblerait donc que le site contenant des cystéines ne soit pas structuré dans la forme déstructurée. Afin d'identifier les ligands du métal dans le site produisant le signal CD qui est corrélié au signal Mössbauer à $\delta = 0.89 \text{ mm.s}^{-1}$ et à la structuration de la protéine, nous avons réalisé une étude par mutagenèse dirigée en ciblant les acides aminés invariants du site d'assemblage : Cys35, Asp37, Cys61, His103 et Cys104 (**Figure 1f article#2**). Nous avons mis en évidence que les substitutions des cystéines Cys35 et Cys61 et de l'aspartate Asp37 abolissaient totalement la liaison du fer dans ce site. Par contre, avec le mutant H103A un signal CD faible est détecté mais la spectroscopie Mössbauer montre l'absence de fer dans un site contenant des cystéines. La substitution de Cys104 en sérine n'empêche pas la fixation du fer dans le site contenant des cystéines et elle n'affecte pas les paramètres Mössbauer. Nous en avons conclu que le fer se lie dans le site d'assemblage d'ISCU par quatre résidus invariants Cys35, Asp37, Cys61 et His103 et qu'un seul fer se lie dans ce site. Par la suite nous avons appelé Fe-ISCU cette forme liant du fer dans le site d'assemblage. Nous avons également cherché à évaluer la stabilité du fer dans Fe-ISCU. Nous avons constaté que le fer de Fe-ISCU est partiellement perdu par dessalage sur colonne d'exclusion de taille, ce qui indique que le fer est labile dans ce site. De plus, une exposition à l'air conduit immédiatement à la perte totale du signal CD du Fe(II) dans le site d'assemblage d'ISCU et la formation de Fe^{3+} libre, ce qui indique que le fer dans ISCU n'est pas stable sous forme Fe(III).

1.3.2 Activités catalytiques de Fe-ISCU et Zn-ISCU

Nous avons ensuite évalué la capacité de Zn-ISCU et Fe-ISCU à former des centres Fe-S. Pour cela nous avons réalisé des réactions d'assemblage avec toutes les protéines de la machinerie ISC. Les réactions sont réalisées dans des conditions catalytiques en présence de $100 \mu\text{M}$ de Fe-ISCU ou Zn-

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

ISCU, 5 μM de NFS1-ISD11-ACP, FXN et du couple FDX2/FDXR, 200 μM de NADPH et 100 μM d'ions Fe^{2+} dans le cas de Zn-ISCU (**Figure 43**). Les réactions ont été initiées par l'ajout de 100 μM de L-cystéine et suivies par CD. Dans ces conditions, un spectre caractéristique de centres $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ est détecté dans la réaction avec Fe-ISCU, tandis qu'avec Zn-ISCU la quantité de centres Fe-S est extrêmement faible (**Figure 2a article#2**). Nous avons également suivi les cinétiques de réaction par UV-visible à une longueur d'ondes de 456 nm qui correspond au maximum d'absorption des centres $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ et où il n'y a pas d'interférences avec le NADPH.

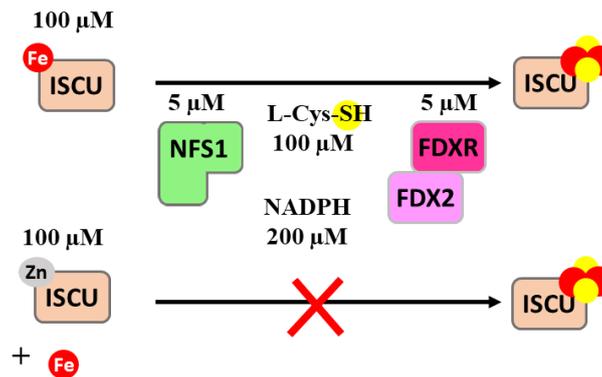


Figure 43 Méthode utilisée pour suivre la formation des centres Fe-S en conditions catalytiques avec Fe-ISCU ou Zn-ISCU.

La réaction avec Fe-ISCU montre une formation de centres Fe-S rapide, terminée au bout de 3 minutes, alors qu'avec Zn-ISCU la réaction est extrêmement lente (**Figure 2b article#2**). L'allure de la cinétique avec Fe-ISCU montre une progression quasiment linéaire dans les premières minutes de la réaction avant de ralentir brusquement pour atteindre un plateau lorsque la L-cystéine a été consommée. Ce comportement est caractéristique d'une réaction enzymatique dans laquelle la fixation du substrat est rapide, ce qui permet d'atteindre rapidement un état stationnaire. La vitesse de formation du produit est alors constante (réaction d'ordre 0). Nous avons également observé la formation de centres $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ dans des conditions où NFS1 et FXN sont présentes en quantités stœchiométriques par rapport à ISCU (appelé conditions stœchiométriques), mais dans ces conditions l'allure de la cinétique est celle d'une réaction d'ordre 1 (**Figure 4e article#2**). Ces réactions sont réalisées avec 100 μM de Fe-ISCU, NFS1-ISD11-ACP et FXN, 10 μM de FDX2, 1 μM de FDXR et 200 μM de NADPH. La réaction est initiée avec 100 μM de L-cystéine. Dans ces conditions, la cinétique prend une allure exponentielle qui est caractéristique des réactions mono moléculaires d'ordre 1. Nous verrons dans la section suivante, une analyse cinétique détaillée de ces réactions qui va nous apporter des informations sur le mécanisme de ces réactions.

L'analyse du produit final de la réaction en conditions catalytiques par spectroscopie Mössbauer montre uniquement la présence de centres $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ dans lequel les deux atomes de fer sont oxydés à

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

l'état Fe(III) (**Figure 2c article#2**). De plus, les paramètres Mössbauer des deux atomes de fer sont différents ce qui indique que la coordination du centre [2Fe2S] est asymétrique, ce qui est cohérent avec les études menées ultérieurement montrant une coordination du centre [2Fe2S] par les résidus Cys35, Cys61, Cys104 et Asp37 (Shimomura & al, 2008 ; Bonomi & al, 2011 ; Marinoni & al, 2012 ; Kunichika & al, 2021). Les analyses par spectrométrie de masse native ont montré la présence de deux formes oligomérique d'ISCU en fin de réaction, un monomère liant un centre [2Fe2S] qui est l'espèce très largement majoritaire et une espèce dimère minoritaire (**Figure 2d article#2**). Ces résultats indiquent donc que dans ces conditions, la machinerie ISC eucaryote synthétise exclusivement des centres [2Fe2S] et pas de centres [4Fe4S], alors que dans les réactions utilisant le DTT à la place de la ferrédoxine FDX2 les deux types de centres Fe-S sont formés (Agar & al, 2000 ; Tsai & al, 2010, Colin & al, 2013). De plus, l'analyse par MS native montre que ISCU est majoritairement présente sous forme monomérique coordonnant un seul centre [2Fe2S]. Les cinétiques d'assemblage montrent également qu'en absence du couple FDX2/FDXR, la formation des centres Fe-S est quasiment abolie, ce qui montre que la formation de centres Fe-S est dépendante de FDX2 (**Figure 2g article#2**). Enfin, les titrations de centres [2Fe2S] par le fer et la cystéine montrent qu'environ 95% du fer et de la L-cystéine sont incorporés sous forme de centre Fe-S, ce qui indique donc que la réaction est très efficace (**Figure 2e,f article#2**).

En absence de FXN l'assemblage est fortement ralenti mais la réaction conduit toujours à la formation exclusive de centres [2Fe2S] et dans des quantités comparables à celles observées en présence de FXN (**Figure 2g article#2**). FXN semble donc agir comme un régulateur cinétique de cette réaction, pas comme une enzyme essentielle du processus

1.3.3 Mécanisme de formation de centre Fe-S, rôle de FDX2

Nous avons ensuite étudié le mécanisme par lequel les centres Fe-S sont formés avec la méthode ARBS de détection des persulfures couplée à la spectrométrie de masse. En présence de L-cystéine, nous avons constaté que le persulfure de NFS1 est transféré à Fe-ISCU et également à Zn-ISCU (**Figure 3a article#2**). Les analyses par alkylation ARBS et par MS ont montré qu'un seul persulfure est transféré à un seul résidu cystéine d'ISCU et nous avons pu exclure la présence de polysulfures (**Figure 3d article#2**). De plus, le transfert est aboli avec le mutant C104S de Fe-ISCU (**Figure 3b article#2**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment au laboratoire montrant un transfert de persulfure à la forme purifiée d'ISCU et ils confirment également que Cys104 est le récepteur de persulfure (Parent & al, 2015). Etant donné qu'il n'y a pas accumulation de persulfure sur d'autres cystéines dans le mutant C104S, on peut en conclure que le transfert à Cys104 ne se fait pas par relais à Cys35 ou Cys61, mais qu'il est direct. Enfin, nous avons constaté que le transfert est totalement aboli avec apo-ISCU mais fonctionne en présence d'un métal, le fer et le zinc étant tous deux capables d'assurer le transfert (**Figure 44 et Figure 3b article#2**). Cependant, le laboratoire avait également

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

observé un transfert de persulfure avec la protéine ISCU qui n'avait pas subi de traitement DTPA pour insérer le fer ou le zinc (Parent & al, 2015). Il s'avère maintenant que ces échantillons contenaient naturellement du zinc, ce qui explique pourquoi un transfert de persulfure avait pu être observé. L'ensemble de ces données montre donc clairement que le fer se fixe en premier dans ISCU puis le soufre et que l'insertion du persulfure est couplée à la présence de fer dans ISCU.

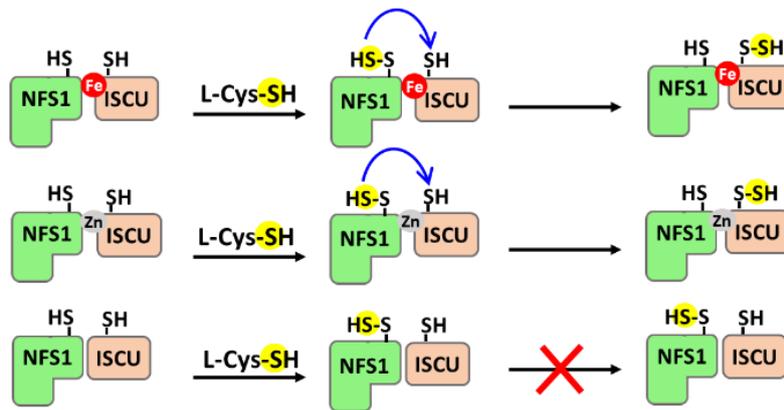


Figure 44 Transfert de persulfure métal-dépendant entre NFS1 et ISCU. Lorsqu'ISCU est incubée avec du fer ou du zinc, NFS1 transfère son persulfure à ISCU. Cependant, en absence de métal, NFS1 n'est plus capable de transférer son persulfure à ISCU. Ce mécanisme est donc métal-dépendant.

Nous avons également montré que le couple FDX2/FDXR permet la réduction du persulfure de Fe-ISCU et que cette réduction est concomitante de la formation de centres Fe-S (**Figure 45** et **Figure 3a,e article#2**). Par contre, le couple FDX2/FXDR n'est pas capable de réduire le persulfure de la forme Zn-ISCU ou en absence de métal (**Figure 45**). Ces résultats permettent d'expliquer pourquoi la réaction d'assemblage est inefficace quand du zinc est présent dans le site d'assemblage. La dépendance en fer indique de plus que la formation d'ions sulfures est couplée à la présence du fer dans ISCU.

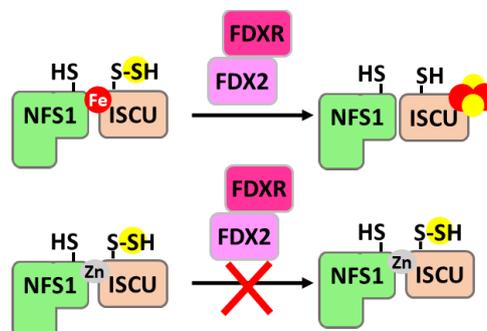


Figure 45 Réduction du persulfure d'ISCU par le couple FDX2/FDXR. Le couple FDX2/FDXR peut réduire uniquement le persulfure de la forme Fe-ISCU menant ainsi à la formation de centres [2Fe2S].

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Un centre [2Fe2S] étant constitué de deux ions fer et deux ions sulfures, nous nous sommes demandé s'il était possible que NFS1 fournisse un second persulfure après réduction du premier sur ISCU ou si le couple FDX2/FDXR était capable de réduire directement le persulfure de NFS1. Pour cela, nous avons testé l'effet de la ferrédoxine sur une forme doublement persulfurée, sur ISCU et NFS1, avec des concentrations sous stœchiométriques et stœchiométriques de L-cystéine afin d'éviter un rechargement de persulfure sur NFS1 (**Figure 3h,i article#2**). Nous avons observé que le persulfure d'ISCU est toujours réduit alors que le persulfure de NFS1 ne l'est pas. Ces données indiquent donc que le couple FDX2/FDXR ne peut pas réduire le persulfure de NFS1 et que la réduction du persulfure d'ISCU ne permet pas le transfert d'un second persulfure.

1.3.4 Mécanisme de stimulation de l'assemblage par FXN

Nous avons par la suite évalué l'effet de la frataxine sur le transfert et la réduction du persulfure avec la méthode ARBS. En absence de FXN, le transfert de persulfure est terminé après 15 - 20 minutes de réaction alors qu'en présence de FXN la réaction est beaucoup plus rapide, avec quasiment la totalité d'ISCU persulfurée après 2 minutes, aussi bien avec Fe-ISCU que Zn-ISCU (**Figure 4a,b,d article#2**). Nous avons ensuite testé l'effet de FXN sur la réduction de persulfure par FDX2. Pour cela, nous avons réalisé des cinétiques en conditions stœchiométriques en incubant une forme pré-persulfurée d'ISCU avec le couple FDX2/FDXR en présence ou absence de FXN (**Figure 4c article#2**). Aucun effet de FXN n'a été observé sur l'étape de réduction du persulfure. Ces résultats indiquent donc que FXN agit sur la vitesse de transfert du persulfure. Pour pouvoir clairement démontrer que l'effet accélérateur de FXN sur la vitesse de transfert est corrélé à son effet global sur la formation de centre [2Fe2S], il est nécessaire de déterminer l'étape cinétiquement limitante de tout le processus d'assemblage. Des résultats précédents du laboratoire avaient montré que la vitesse de formation du persulfure par NFS1 est beaucoup plus rapide que celle du transfert à ISCU, aussi bien en présence qu'en absence de FXN (Parent et al 2015). Ces résultats permettent d'exclure que la formation de persulfure soit la réaction cinétiquement limitante du processus d'assemblage. Nous avons donc cherché à déterminer les constantes de vitesse de transfert et de réduction en présence et absence de FXN, afin de les comparer entre elles et avec la constante apparente de l'ensemble du processus d'assemblage.

Pour établir les lois cinétiques permettant de relier la vitesse globale d'assemblage à celles des réactions de transfert, de réduction de persulfure et de formation de centre Fe-S, nous avons décomposé le processus en réactions élémentaires en considérant un complexe dimérique, selon le schéma présenté **Figure 46**, dans lequel Fe-ISCU et la L-cystéine sont les substrats du complexe NIA et de FDX2, et ISCU-[2Fe2S] monomérique est le produit de cette réaction.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

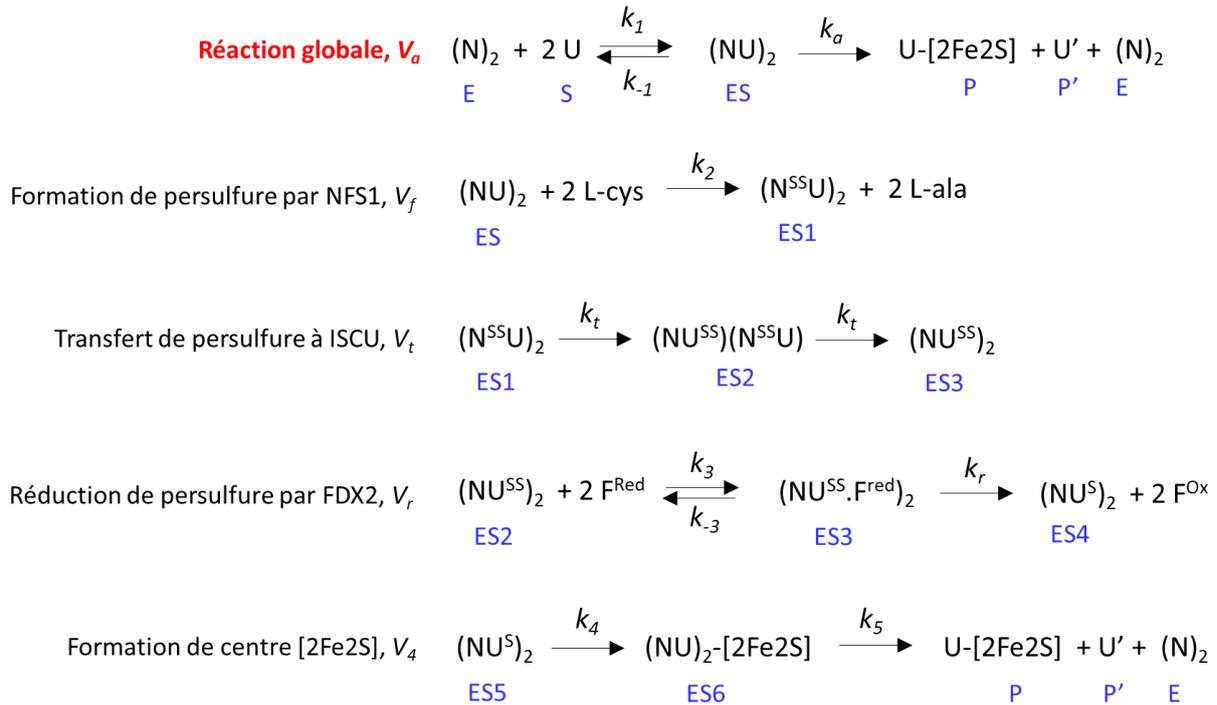


Figure 46 Schéma réactionnel d'assemblage. N représente le complexe NIA ; N^{SS} , la forme persulfurée du complexe NIA ; U, Fe-ISCU ; U', apo-ISCU ; U^{SS} , la forme persulfurée de Fe-ISCU ; U^S , l'intermédiaire [1Fe1S] dans ISCU ; F^{red} , FDX2 réduite ; F^{ox} , FDX2 oxydée. V_a , V_f , V_t , V_r et V_4 sont respectivement les vitesses de réaction globale d'assemblage, de formation de persulfure, de transfert, de réduction et de formation de centres Fe-S associées aux constantes de vitesse de k_a , k_f , k_t , k_r et k_4 en min^{-1} . Les concentrations des différentes espèces sont indiquées en bleu.

Dans ce modèle, la vitesse globale de la réaction d'assemblage, V_a , s'exprime par une loi du premier ordre selon l'équation (14) :

$$(14) \quad V_a = \frac{dP}{dt} = k_a ES$$

où **ES** est à la concentration en complexe dimérique $(NIAU)_2$, k_a la constante apparente d'assemblage en min^{-1} et **P** la concentration en monomère d'ISCU avec un centre [2Fe2S]. Dans le cas où une étape est cinétiquement limitante, la vitesse de formation du produit est considérée comme étant égale à celle de cette réaction, ce qui conduit aux équations (15) et (16) si le transfert ou la réduction sont les étapes limitantes. Dans ce modèle, nous avons considéré que chaque sous-unité du complexe $(NIAU)_2$ fonctionnait de manière indépendante et donc que les vitesses de transfert et de réduction de persulfure dans chaque sous-unité sont équivalentes.

$$(15) \quad V_a = V_t = k_t ES2$$

$$(16) \quad V_a = V_r = k_r ES3$$

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

où **ES1** est la concentration en enzyme persulfurée exprimée en monomère, **ES3** celle en complexe avec FDX2, k_t et k_r les constantes de transfert et de réduction de persulfure en min^{-1} et **P** la concentration en monomère d'ISCU avec un centre [2Fe2S]. Dans les deux cas, les lois cinétiques sont du 1^{er} ordre, il est donc possible de comparer directement les constantes de vitesses k_a , k_t et k_r . Sur la base de ce modèle nous avons déterminé les constantes de vitesse de l'assemblage puis du transfert et de la réduction.

1.3.4.1 Vitesse globale d'assemblage des centres Fe-S

Pour déterminer k_a , nous avons utilisé les équations de Michaelis-Menten qui sont valides dans des conditions d'état stationnaires dans lesquelles la concentration en enzyme-substrat ne varie pas. De plus, dans des conditions où l'équilibre enzyme/substrat est rapidement atteint, la cinétique de formation du produit suit une croissance linéaire. L'allure des cinétiques d'assemblage montre clairement que l'évolution de la concentration en centre Fe-S est linéaire, puis atteint un plateau de manière abrupte quand le substrat est épuisé (**Figure 1g article#2**). Cela indique donc que la réaction d'assemblage est dans un état stationnaire et que l'approximation de l'équilibre rapide peut être utilisée. Dans ces conditions, la vitesse initiale de réaction V_i , et la vitesse maximum, V_{max} , s'expriment comme suit :

$$(17) \quad V_i = \frac{dP}{dt} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_M}$$

$$(18) \quad V_{\text{max}} = k_a \cdot E_0$$

où **P** est le produit de la réaction, S_0 la concentration initiale en substrat, K_M la constante de Michaelis-Menten, k_a la constante de vitesse de formation du produit d'assemblage en min^{-1} et E_0 la concentration initiale en enzyme (ici en complexe dimérique NIAU). Nous avons par ailleurs constaté que la vitesse de la réaction ne variait pas en changeant la concentration en L-cystéine, sur une large gamme comprise entre 50 μM et 400 μM (**Figure supplémentaire 2b article#2**). Cela indique que la réaction a atteint sa vitesse maximale, où V_i devient égal à V_{max} , ce qui conduit à l'équation (19) après intégration de l'équation (18) :

$$(19) \quad [P] = k_a \cdot E_0 \cdot t$$

Par régression linéaire et une moyenne sur une dizaine de cinétiques, nous avons mesuré des constantes de vitesse apparentes, k_a , de $2,3 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$ en présence de FXN et de $0,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ en absence de FXN. Nous avons ensuite mesuré les vitesses de transfert et de réduction indépendamment.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

1.3.4.2 Vitesse de transfert

Le transfert de persulfure est une réaction interne dans le complexe NFS1-ISCU (**Figure 47**). Ce type de réaction est unimoléculaire et peut-être décrit par l'équation (20) qui donne l'évolution de la concentration du produit en fonction du temps :

$$(20) \quad [P] = [P_0] (1 - \exp(-k_t \cdot t))$$

avec **P** la quantité d'ISCU-SSH (persulfurée), **P₀** la quantité initiale d'ISCU non persulfurée, **k_t** la vitesse de transfert du persulfure de NFS1 à ISCU et **t** le temps. Les quantifications des gels nous ont permis de tracer les courbes de pourcentage d'ISCU persulfurée en fonction du temps. Les ajustements des données expérimentales avec l'équation 20 nous ont montré un très bon accord, ce qui permet de confirmer la loi cinétique et donc le mécanisme de cette réaction (**Figure 4d article#2**). Nous avons ainsi obtenu des constantes de vitesse du transfert de persulfure de $2,4 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ en présence de FXN et de $0,2 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ en absence de FXN

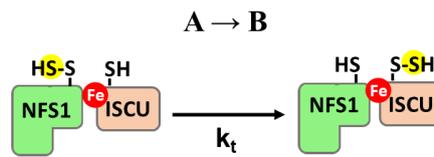


Figure 47 Schéma illustrant le transfert de persulfure associé à la constante de vitesse k_t .

1.3.4.3 Vitesses de réduction

Nous avons ensuite déterminé une constante apparente, k_{obs} , pour la réduction incluant la réduction de persulfure par FDX2 et la formation du centre $[2Fe_2S]$, en suivant la formation du centre $[2Fe_2S]$ après ajout de FDX2 au complexe NIAU persulfuré (**Figure 48**).

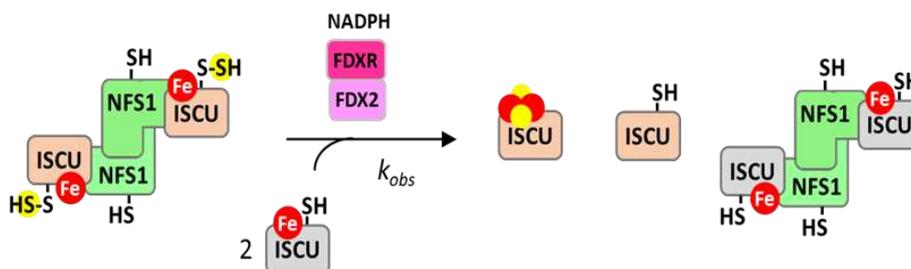


Figure 48 Schéma illustrant la réaction de réduction associée à la constante de vitesse k_{obs} .

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

D'après le schéma en **Figure 48**, la vitesse globale de cette réaction, V_{obs} , peut s'exprimer par une loi cinétique du premier ordre car toutes les réactions élémentaires intermédiaires sont également du premier ordre, où **P** est la concentration en monomère d'ISCU-[2Fe2S], k_{obs} la constante apparente du premier ordre et **ES** la concentration en complexe dimérique (**équation 21**). Nous avons ensuite utilisé les équations de Michaelis-Menten pour déterminer k_{obs} où E_0 est la concentration en complexe dimérique (**équation 22**) :

$$(21) \quad V_{obs} = \frac{dP}{dt} = k_{obs} ES$$

$$(22) \quad [P] = k_{obs} \cdot E_0 \cdot t$$

Par régression linéaire aux temps courts de la réaction (**Figure 4c article#2**), nous avons obtenu des constantes k_{obs} de l'ordre de $4,5 \text{ min}^{-1}$ en absence et présence de FXN.

En conclusion, la vitesse globale de formation de centres Fe-S est du même ordre de grandeur que celle de transfert de persulfure aussi bien en présence qu'en absence de FXN. De plus, ces vitesses sont inférieures à celles de réduction ; d'un facteur 20 en absence de FXN, ce qui est compatible avec un régime où le transfert est la réaction cinétiquement limitante. Néanmoins, en présence de FXN les vitesses de transfert et de réduction apparente sont relativement proches, ce qui laisse supposé que le régime cinétique n'est plus uniquement déterminé par le transfert de persulfure, mais est sensible aux deux réactions. Au final, ces résultats permettent d'établir que FXN stimule la biosynthèse de centres Fe-S en accélérant le transfert de persulfure.

1.3.5 Mécanisme de formation de centres Fe-S par la voie dépendante du DTT

Nous avons montré que très peu de centres Fe-S étaient formés avec Zn-ISCU dans les reconstitutions en conditions catalytiques avec FDX2. Cependant, les réactions d'assemblage rapportées dans la littérature qui utilisaient des protéines ISCU non traitées préalablement par un chélateur de métaux, donc contenant probablement du zinc (en quantités indéterminées), avaient montré la possibilité d'assembler des centres Fe-S. Ces réactions ayant été réalisées avec du DTT, de la L-cystéine ou bien du GSH comme réducteurs et à des concentrations très élevées (entre 1 et 3 mM), nous avons testé la capacité de Zn-ISCU à former des centres Fe-S dans ces conditions à différentes concentrations en L-cystéine. Ces réactions ont été réalisées avec $100 \mu\text{M}$ de Zn-ISCU, $5 \mu\text{M}$ de NFS1-ISD11-ACP, FDX2 et FXN, $1 \mu\text{M}$ de FDXR, $200 \mu\text{M}$ de fer et des concentrations croissantes de L-cystéine de $100 \mu\text{M}$ à 1 mM (**Figure 5a article#2**). Nous avons observé une augmentation de la quantité de centres Fe-S formés proportionnelle à la concentration en L-cystéine. Mais la vitesse de cette réaction est environ 100 fois plus lente qu'avec FDX2 et requiert 30 fois plus de L-cystéine pour atteindre le même plateau.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Nous avons constaté que la vitesse de cette réaction est dépendante de la concentration en L-cystéine, ce qui indique que l'étape cinétiquement limitante implique la L-cystéine. Sachant que la L-cystéine réduit très difficilement le persulfure de Zn-ISCU (Parent & al, 2015), la seule source de soufre ici est NFS1. Le mécanisme de cette réaction semble donc être la réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine, comme décrit précédemment au laboratoire (**Figure 49**). Le mécanisme de formation des ions sulfures le plus probable serait donc la formation de cystéine persulfurée suivie d'une étape de réduction par une autre molécule de cystéine conduisant à la formation de sulfure (S^{2-}/HS^-) et de cystine (Cys-SS-Cys) (**Figure 49**). Étonnamment, FDX2 accélère cette réaction thiol-dépendante (**Figure 5c article#2**), il est possible que FDX2 soit capable de réduire la cystéine persulfurée en présence de fer. Comme montré précédemment également, FXN accélère cette réaction d'assemblage en facilitant la réduction du persulfure de NFS1 par la L-cystéine.

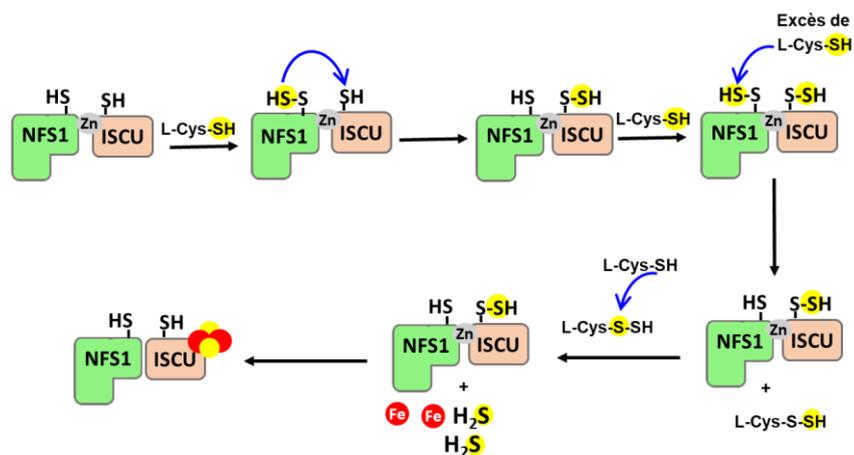


Figure 49 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par la voie thiol-dépendante. Une fois le complexe NFS1-ISCU doublement persulfuré, les thiols comme la L-cystéine réduisent le persulfure de NFS1 produisant de la L-cystéine persulfurée (L-Cys-S-SH). Le persulfure d'ISCU n'est pas ou très difficilement accessible par les différents thiols pour être réduit. La cystéine persulfurée est par la suite réduite par une autre molécule de cystéine menant à la formation de H_2S et de cystine. Les molécules de H_2S peuvent réagir avec le fer dans le milieu réactionnel afin de former de manière non spécifique des centres Fe-S.

1.3.6 Discussion intermédiaire

Les résultats de cette étude nous ont permis d'établir un modèle pour le processus d'assemblage des centres Fe-S incluant les fonctions de FDX2 et de FXN (**Figure 50**). Nos données indiquent que le zinc empêche l'insertion du fer dans le site d'assemblage d'ISCU. Mais en absence de zinc, apo-ISCU lie un ion Fe^{2+} dans son site d'assemblage (**intermédiaire 1**). Après formation d'un complexe avec NFS1, un persulfure est transféré à ISCU sur sa cystéine 104 (**intermédiaire 2**). Ce persulfure est ensuite réduit par FDX2 ce qui conduit à la formation d'un centre $[2Fe2S]$ coordonné par un monomère d'ISCU (**intermédiaire 5**). Cette dernière réaction est clairement un processus multi-étape pour lequel nous

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

pouvons émettre des hypothèses quant à la nature de ses intermédiaires. Nous avons montré qu'au cours de cette réaction, un seul persulfure est fourni à ISCU et donc un seul ion sulfure est généré par ISCU. De plus, la titration en fer indique qu'un seul fer est présent dans ISCU. Ces résultats nous ont amené à l'hypothèse qu'une espèce $[1Fe1S]$ serait formée à l'issue de la réduction par FDX2 (**intermédiaire 3**) qui conduirait à la formation d'un centre binucléaire $[2Fe2S]$ pontant par dimérisation de deux monomères d'ISCU (**intermédiaire 4**). Notre hypothèse est que la dimérisation serait assistée par NFS1 via sa conformation dite « ouverte » dans laquelle les deux protéines ISCU sont adjacentes.

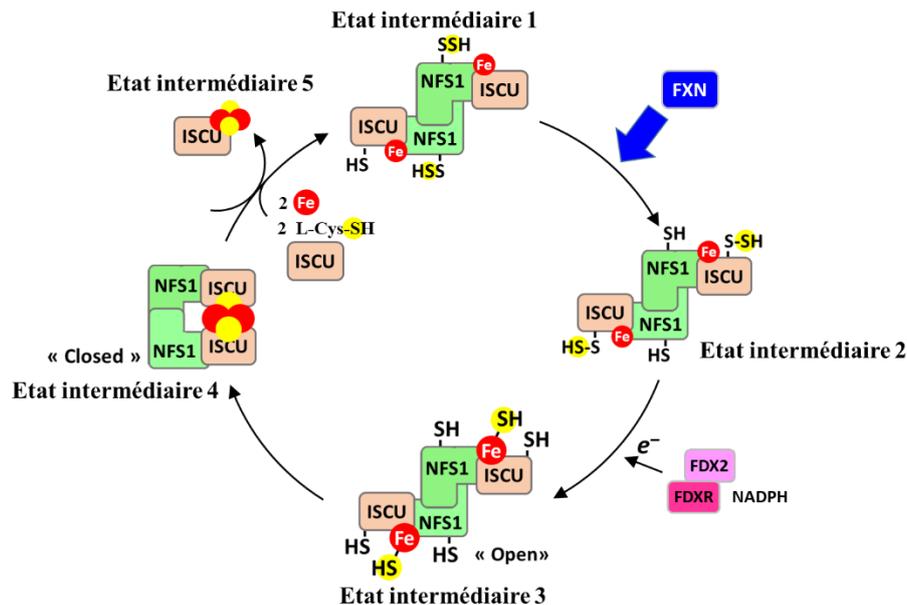


Figure 50 Modèle du mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par la voie FDX2-dépendante chez les eucaryotes.

Le centre pontant migrerait ensuite dans une des deux sous-unités du dimère d'ISCU, permettant alors la dissociation du dimère. Enfin, le monomère d'ISCU contenant un centre $[2Fe2S]$ se dissocierait de NFS1 par échange avec apo-ISCU ou Fe-ISCU conduisant alors à un monomère d'ISCU libre qui serait pris en charge par le système chaperon HSC20/HSPA9 (**intermédiaire 5**). Les sites de reconnaissances d'ISCU par le système chaperon étant masqués dans le complexe NFS1-ISCU et potentiellement aussi par FXN et FDX2, il semble plus probable que les chaperonnes interagissent avec ISCU libre qu'avec ISCU en complexe, sinon ce système viendrait induire la dissociation du complexe en entrant en compétition avec NFS1. De plus, nos études de reconstitution suggèrent que le système chaperon n'est pas nécessaire pour la dissociation d'ISCU car le produit de la réaction en leur absence est du ISCU libre. A la suite de la dissociation d'ISCU, un nouveau cycle d'assemblage serait alors enclenché par reformation du complexe dans l'état **intermédiaire 1**.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Nos résultats indiquent également que le transfert et la réduction de persulfure dans ISCU sont des étapes dépendantes du fer dans le site d'assemblage d'ISCU. Ce mécanisme permettrait à la fois de coordonner l'apport en persulfure à ISCU et la formation d'ions sulfures avec la présence du fer et ainsi contrôler la quantité de soufre délivré à ISCU et empêcher la libération d'ions sulfures en solution. Inversement, en absence de FDX2, les thiols comme la L-cystéine viennent réduire le persulfure de NFS1. Cette réaction n'est pas synchronisée avec la présence de fer et n'est pas confinée dans ISCU, ce qui conduit à la libération d'ions sulfures en solution. Cela explique notamment pourquoi cette réaction est peu efficace et d'autant plus lente si du zinc est présent dans le site d'assemblage d'ISCU. Les thiols ne sont donc pas capables de « mimer » la réduction du persulfure d'ISCU par FDX2. Cette voie alternative ne semble donc pas physiologiquement pertinente pour l'assemblage de centres Fe-S.

Enfin nos travaux montrent que FXN n'est pas requise pour l'insertion du fer dans ISCU et n'est pas non plus capable d'échanger le zinc par du fer. Ces données permettent donc d'invalider l'hypothèse de chaperonne à fer. Par contre, nos données montrent que FXN stimule l'assemblage des centres Fe-S dans la réaction FDX2-dépendante, en accélérant le transfert de persulfure. FXN stimule également la production d'ions sulfures par la voie thiol-dépendante, mais cette réaction n'étant pas pertinente physiologiquement, par rapport à la réaction FDX2-dépendante, cette fonction ne peut pas être considérée comme pertinente non-plus pour expliquer l'effet de FXN *in vivo*.

1.4 Etude des formes structurée et déstructurée d'ISCU et leur liaison au complexe

NIA

Nos données ont permis de confirmer des résultats obtenus par les groupes de John Markley (Madison, USA) et Annalisa Pastore (London, UK) montrant que la protéine ISCU existe sous deux formes de structure tertiaire différentes : une forme déstructurée (D) et une forme structurée (S) (**Figure supplémentaire 1a et 1b article #2**). Ces études suggéraient de plus que les formes S et D sont en équilibre. Le groupe de J. Markley avait proposé sur la base de données RMN que seule la forme déstructurée se lie au complexe (Kim & al, 2012). Cependant, une étude RMN par le groupe d'A. Pastore avait montré avec le complexe bactérien, qu'IscU est liée sous forme structurée à IscS (Yan & al, 2014). Nous avons donc entrepris une étude de la fixation de la forme apo-ISCU et ISCU métallée (Fe-ISCU) à NFS1 par RMN. Pour étudier les interactions protéine-protéine nous avons utilisé les propriétés de largeur de raies qui sont sensibles à la taille des protéines étudiées. La largeur des signaux RMN est sensible à la relaxation qui elle-même est sensible la vitesse de rotation des macromolécules et qui diminue à mesure que la taille des protéines augmente. Par conséquent, plus la taille d'un complexe protéique est importante, plus les signaux sont élargis, les rendant quasiment indétectables. La formation d'un complexe entre NFS1-ISD11-ACP et ISCU pourra donc être suivie par RMN en étudiant la largeur des raies. Lorsque apo-ISCU est incubée avec le complexe NIA, la totalité des signaux d'ISCU en RMN

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

2D (^{15}N - ^1H) deviennent invisibles (**Figure 51a spectre violet**), seuls les signaux appartenant au domaine C-terminal flexible d'ISCU persistent car ils ont leur propre rotation interne. Cela montre qu'un complexe se forme entre apo-ISCU et NFS1. De plus, les deux formes, S et D, d'apo-ISCU disparaissent ce qui suggère que soit les deux formes sont capables de se lier au complexe NIA, soit seulement l'une d'entre elles se fixe, ce qui déplace l'équilibre et permet à la totalité d'apo-ISCU de se lier au complexe. Lorsque Fe-ISCU est incubé avec le complexe NIA (**Figure 51b spectre rouge**) seuls les signaux de la forme S disparaissent ce qui indique que la forme structurée se lie au complexe NIA. Par contre, les signaux correspondant à la forme déstructurée persistent, ce qui indique que la forme déstructurée ne peut pas se lier à NFS1. En conclusion, nos données vont dans le même sens que celles publiées par A. Pastore montrant que dans le complexe IscS-IscU, IscU est structurée que ce soit sous forme métallée ou non. Au cours de ma thèse, des structures du complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU humain ont été résolues par le groupe de Myroslav Cygler montrant également qu'ISCU se lie sous forme structurée à NFS1 que ce soit sous forme apo ou métallée (avec du zinc).

Pour pouvoir résoudre la structure du complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU et pouvoir notamment répondre à la question de la structure d'ISCU dans le complexe, nous avons tenté de produire une forme deutérée du complexe, nécessaire pour diminuer l'élargissement des pics. Cependant en raison de rendements extrêmement faibles du complexe NFS1-ISD11-ACP nous avons dû renoncer.

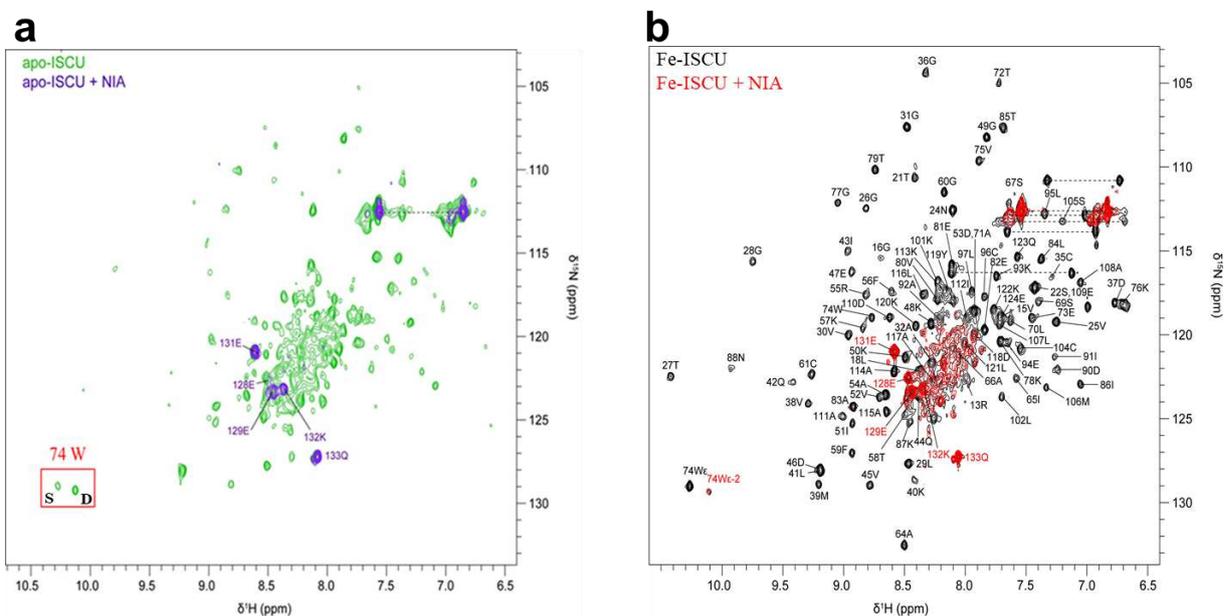


Figure 51 Spectre RMN 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC. **(a)** Spectre ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC d'apo-ISCU (spectre vert) et d'apo-ISCU incubé avec le complexe NIA (spectre violet). **(b)** Spectre ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC de Fe-ISCU (spectre noir) et de Fe-ISCU incubé avec le complexe NIA (spectre rouge).

1.5 Fixation de la frataxine sur le complexe NFS1-ISD11-ACP-ISCU

Les données de RMN 1D publiées dans l'**article#2** ont confirmé la formation d'un complexe entre NFS1-ISD11-ACP, apo/Zn-ISCU et FXN. Néanmoins l'interaction de FXN avec ce complexe semble être dynamique et transitoire, nous avons alors voulu déterminer une constante d'affinité de FXN pour le complexe NIAU. Pour cela, nous avons incubé différents ratios de complexe NIAU et de FXN puis nous les avons analysés par RMN 1D. Nous pouvons visualiser 6 pics distincts dans la région des méthyles lorsque la frataxine est seule. Lorsque la frataxine est incubée avec le complexe NIAU en ratio molaire 1:1, les pics sont plus larges et moins intenses, ce qui indique la fixation de FXN au complexe NIAU (**Figure 52, spectre violet**), cependant une partie de la frataxine reste libre. La disparition quasi complète des pics indiquant que toute la frataxine est liée au complexe NIAU, est obtenue avec un ratio NIAU:FXN de 4:1 (**Figure 52, spectre noir**). Grâce à cette titration, nous avons pu déterminer une valeur approximative de la constante de dissociation K_D entre la frataxine et le complexe NIAU. Pour cela, nous avons tracé une courbe en utilisant la hauteur des signaux de la FXN (donc leur intensité) dans la région méthyle en fonction du ratio NIAU:FXN (**Figure 53**). Le fit a été réalisé grâce au logiciel Origin, et permet d'obtenir une approximation du K_D de la FXN pour le complexe NIAU de l'ordre de 10^{-6} (**Figure 53**). En **Figure 53**, uniquement la courbe pour un pic est présentée, cependant l'analyse des autres pics permet d'obtenir une estimation du K_D équivalente.

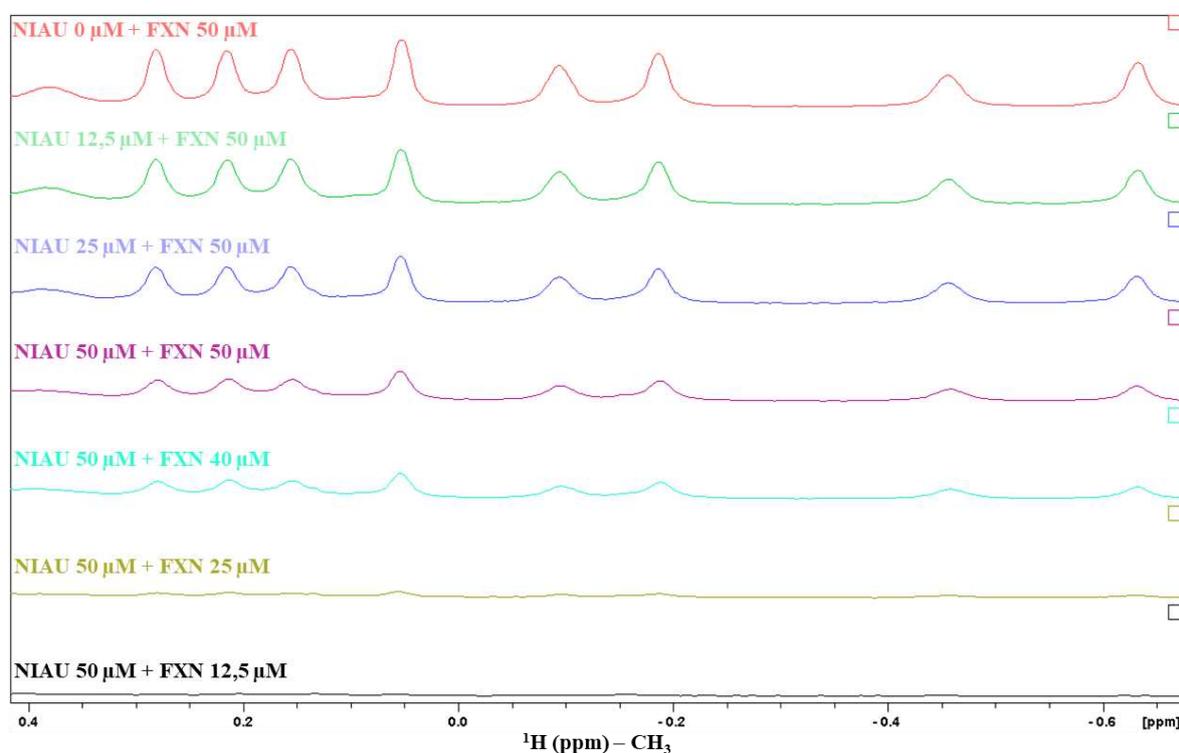


Figure 52 Formation du complexe NIAUF. Spectre RMN 1D ^1H zoomé dans la région méthyle (CH_3) de la FXN. La FXN est incubée avec différents ratios de complexe NIAU. Les spectres ont été acquis à 293 K à 800 MHz.

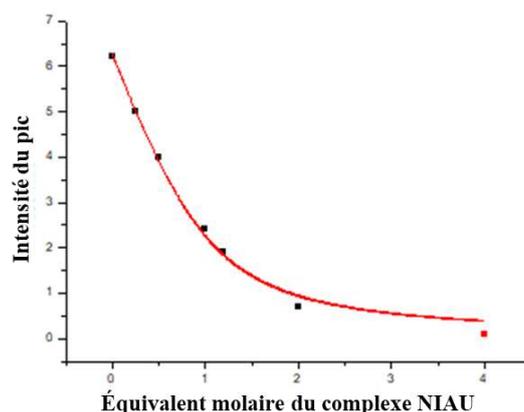


Figure 53 Détermination du K_d de la FXN pour le complexe NIAU. Les points expérimentaux correspondent à l'intensité d'un des pics de la FXN dans la région méthyle en fonction de la concentration du complexe NIAU par rapport à la FXN. La courbe rouge représente le meilleur fit obtenu.

1.6 Formation du centre binucléaire [2Fe2S]

Sur la base des titrations en fer et en persulfure dans ISCU réalisées au cours de la réaction et présentées dans l'article #2 nous avons émis l'hypothèse que la formation de centres [2Fe2S] repose sur la dimérisation de deux espèces ISCU-[1Fe1S] en dimère pour former un centre [2Fe2S] pontant. Nous avons donc tenté de détecter un dimère d'ISCU par cinétique « rapide ».

1.6.1 Cinétique à temps court pour détecter un dimère transitoire

Si un dimère se forme il aura probablement une structure symétrique dans laquelle le centre [2Fe2S] serait lié soit par deux résidus cystéines de chaque ISCU, soit par un résidu cystéine et un résidu oxygène ou azote de chaque ISCU, tandis que le centre [2Fe2S] d'ISCU en fin de réaction est asymétrique lié par 3 résidus cystéines et 1 résidu oxygène ou azote. Ces deux espèces ont donc potentiellement des spectres d'absorption électronique différents. Plusieurs spectres de centres [2Fe2S] inter-domaine ont été rapportés dans la littérature, notamment les centres [2Fe2S] des dimères de glutarédoxines monothiols dans lesquelles le centre Fe-S est coordonné par une cystéine de la glutarédoxine et une molécule de GSH. Les spectres d'absorption présentent des pics d'absorption intenses vers 320 et 410 nm (Rouhier & al, 2007, Bandyopadhyay & al, 2008, Picciocchi & al, 2007), tandis que pour le centre [2Fe2S] d'ISCU, les pics les plus intenses sont à 320 et 460 nm. D'autres types de centres [2Fe2S] inter-domaine ont également été caractérisés notamment dans le dimère d'ISCA2 et dans le complexe ISCA2-IBA57 qui montre également deux absorptions intenses à 330 et 420 nm (Gourdoupis & al, 2018). Il semble donc possible de distinguer les spectres d'un centre [2Fe2S] dans un

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

monomère d'ISCU de celui dans un dimère sous forme de centre pontant. Nous avons donc tenté de détecter un dimère en enregistrant des spectres UV-visible à temps courts.

Nous avons mesuré des spectres d'absorption toutes les 15 secondes lors de reconstitutions en conditions catalytiques et stœchiométriques (**Figure 54a,b**). Les spectres présentés dans la **Figure 54** représentent les spectres de différence entre le spectre à un temps donné et le spectre à $t=0$. Nous pouvons observer que les absorbances à 320, 405 et 456 nm augmentent au cours du temps et sont caractéristiques de la formation du centre $[2Fe_2S]$ d'ISCU souris. Les changements observés vers 340 nm correspondent à la consommation du NADPH au cours de la réaction et donc cette région est difficilement exploitable, notamment en fin de réaction. Par contre, entre 0 et 30 secondes très peu de NADPH a été consommé, il est donc possible de comparer ces spectres avec le spectre final attendu. On peut observer dans les temps courts en conditions stœchiométriques la présence d'un pic aux alentours de 600 nm qui est très intense par rapport aux pics à 320, 405 et 456 nm mais qui est quasiment absent dans les spectres finaux. Cela pourrait indiquer la présence d'une espèce transitoire. Cependant les différences d'intensité attendues à 420 et 460 nm ne sont pas observées. En conditions stœchiométriques, les spectres présentent un pic d'absorption à 385 nm au temps courts qui semble progressivement décalé à 405 nm (**Figure 54b**). Cependant dans cette région la protéine NFS1 absorbe fortement et son spectre est modifié en présence de L-cystéine due à la formation du persulfure, il n'est donc pas possible de conclure avec certitude, d'autant que cette zone chevauche le pic d'absorption du NADPH. Les variations observées à 600 nm pourraient donc indiquer la présence d'une espèce transitoire, mais il est impossible de conclure s'il s'agit effectivement d'un dimère sur la base de ces données UV-visible.

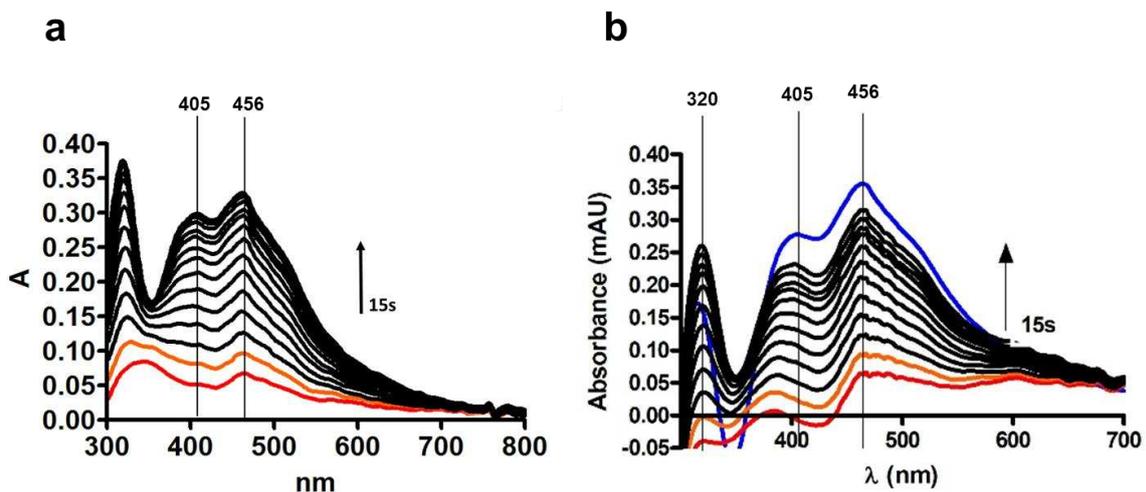


Figure 54 Caractérisation spectroscopique d'un dimère d'ISCU. Série de spectres UV-visible d'une reconstitution en conditions catalytiques (**a**) ou stœchiométriques (**b**) réalisé toutes les 15 secondes. Ces spectres sont des spectres de différence entre le spectre à un temps donné et le premier spectre à $t=0$. La flèche noire représente le sens de progression des spectres au cours du temps. Le spectre bleu correspond au dernier spectre mesuré.

1.6.2 Rôle d'ISD11-ACP dans la dimérisation potentielle d'ISCU

Nous avons émis l'hypothèse que la dimérisation d'ISCU pourrait reposer sur la capacité du complexe NIA à adopter une conformation dite ouverte. La structure du complexe NIAU dans sa forme « fermée » montre que les deux ISCU sont éloignés d'environ 60 Å limitant une potentielle dimérisation. Cependant, la structure du complexe NIA dans sa conformation « ouverte » montre un arrangement dans lequel les protéines ISCU seraient adjacentes. Une modélisation grâce aux sites de fixation des deux ISCU dans la structure du complexe NIA montre que les deux ISCU sont suffisamment proches pour dimériser. Dans cette conformation la surface de dimérisation de NFS1 est très réduite par rapport à la structure fermée (122 Å² dans la conformation ouverte et 2,351 Å² dans la conformation fermée dans le dimère d'IscS), mais des interactions entre les deux protéines ISD11 permettent vraisemblablement de stabiliser cette conformation. La protéine ISD11 pourrait donc être directement impliquée dans l'étape de dimérisation. Pour tester cette hypothèse, nous avons généré une forme de NFS1 humaine sans ses protéines partenaires ISD11 et ACP. Une analyse SDS-PAGE de NFS1 est présentée **Figure 55a** et montre bien l'absence des protéines ISD11 et ACP. Le rendement de purification de cette protéine est faible en raison de sa faible solubilité (< 50 µM ~ 2,2 mg/mL). Cependant, cette gamme de concentrations était suffisante pour réaliser des tests de formation de persulfure et d'assemblage de centres Fe-S (**Figure 55b,c**). Ces études montrent que sans ISD11-ACP la formation de centres Fe-S est totalement abolie (**Figure 55b courbe bleue**). Nous avons alors cherché à savoir quelle étape de l'assemblage des centres Fe-S était affectée. Nous avons commencé par étudier l'étape de formation du persulfure par NFS1 par la méthode ARBS. Dans le complexe NFS1-ISD11-ACP, en absence de L-cystéine, NFS1 est présente sous une forme majoritairement non persulfurée avec 7 résidus cystéines alkylés avec une forme minoritaire à plus bas poids moléculaire qui peut être une forme persulfurée ou oxydée de la protéine (**Figure 55c, panel de gauche NFS1-SH**). Lorsque le complexe est incubé avec 1 équivalent de L-cystéine une bande à plus bas poids moléculaire apparaît correspondant à la forme persulfurée de NFS1 avec 6 résidus cystéines alkylés (**Figure 55c, panel de gauche NFS1-SSH**). La formation du persulfure est terminée en moins de 10 secondes. Dans le cas de NFS1 seule, en absence de L-cystéine, la protéine apparaît majoritairement sous la forme d'une bande correspondant à une forme non persulfurée et une espèce minoritaire pouvant correspondre à une forme persulfurée ou oxydée (**Figure 55c, panel de droite NFS1-SH**). Lorsque la protéine NFS1 est incubée avec 1 équivalent de L-cystéine l'intensité de cette bande ne diminue pas et on ne voit pas d'augmentation de la bande de plus bas poids moléculaire (**Figure 55c, panel de droite NFS1-SSH**). Ces données montrent donc que la protéine NFS1 n'est pas capable de former un persulfure en l'absence de ses partenaires ISD11 et ACP, ce qui explique l'incapacité du système reconstitué avec NFS1 à former des centres Fe-S. Etant donné que la première étape du processus d'assemblage est bloquée, il ne nous a pas été possible d'utiliser ce système pour étudier le rôle d'ISD11-ACP dans la dimérisation du complexe pour former le centre binucléaire [2Fe2S].

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

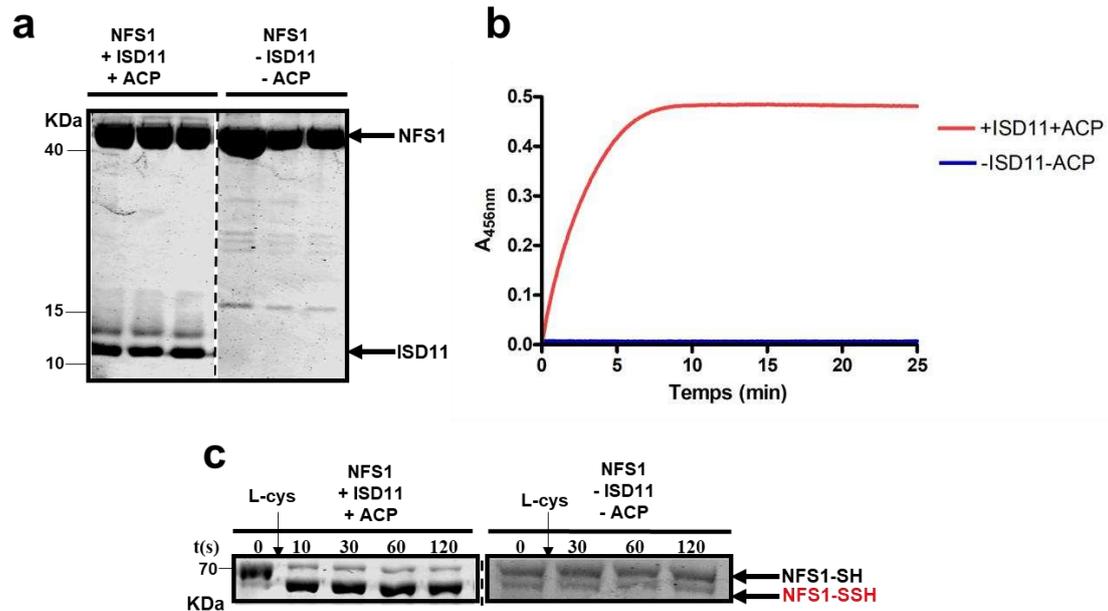


Figure 55 Caractérisation d'une NFS1 sans ISD11-ACP. (a) Profil d'alkylation du complexe NIA (à gauche) et de NFS1 seule (à droite). (b) Cinétique d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm en présence ou absence de ISD11-ACP. (c) Persulfidation du complexe NIA ou de NFS1 seule réalisé par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent de L-cystéine.

1.7 Études structurales des complexes NIAU et NIAUF

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'assemblage des centres Fe-S nous avons cherché à obtenir des structures du complexe NIAUF contenant du fer. Durant ma thèse, plusieurs structures du complexe NIAU et NIAUF ont été résolues mais avec du zinc à la place du fer dans le site d'assemblage. Bien que le zinc soit capable de remplacer le fer pour le transfert de persulfure et l'activation par FXN, le persulfure transféré à ISCU n'est pas réductible par la ferrédoxine en présence de zinc et bien sûr il n'est pas possible de former des centres Fe-S avec du zinc par cette voie-là. Il y avait donc un intérêt important à obtenir des structures avec du fer à la place du zinc. Notre but était de cristalliser les complexes NIAU et NIAUF contenant du fer ainsi que des intermédiaires du processus d'assemblage.

Le premier intermédiaire intéressant à cristalliser était une forme persulfurée de NFS1 en utilisant le mutant C104S d'ISCU afin de bloquer le transfert de persulfure. Des résultats obtenus par Batoul Srour en post-doctorat au laboratoire avaient déjà permis de montrer que dans le complexe formé avec ce mutant, le persulfure est stable et des analyses par UV-visible en suivant l'absorption du persulfure de NFS1 à 340 nm suggéraient que celui-ci se lie au métal (fer et zinc). Ce mutant permettrait donc d'obtenir une structure de ce type d'intermédiaire afin de déterminer si le persulfure de NFS1 est effectivement capable de se lier au métal. La cristallisation de cet intermédiaire en présence de la FXN permettrait ensuite de visualiser le réarrangement au niveau du site métallique afin d'obtenir des réponses sur le fonctionnement activateur de la FXN sur le transfert de persulfure.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Le second intermédiaire d'intérêt était une forme persulfurée d'ISCU avec du fer pour obtenir des informations sur l'arrangement du site métallique avant réduction afin de visualiser si le persulfure est directement lié à l'atome de fer.

Nous avons réalisé des tests de cristallisation en collaboration avec l'équipe du Pr. Marc Fontecave au collège de France où un robot Mosquito® Crystal (TTPLabtech) est installé au sein d'une boîte à gants. Ce robot permet un criblage automatisé des conditions de cristallisation sur plaque 96 réservoirs avec 3 puits pour chaque réservoir permettant de tester 3 concentrations en protéines différentes. Une plaque permet de tester 288 conditions avec un volume très faible en protéines de l'ordre d'une centaine de nanolitres.

1.7.1 Cristallisation de Fe-ISCU

Pour les études de cristallogenèse de Fe-ISCU, apo-ISCU fraîchement purifiée dans du tampon 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH : 8,0 a été incubée avec 1,2 équivalents de Fe²⁺ en présence ou absence de 10 % glycérol. Un récapitulatif des kits utilisés pour la cristallisation de cette protéine est donné dans le **Tableau 5** ci-dessous :

Protéine	Concentration en protéine (mg/mL)	Kit utilisés
Fe-ISCU 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 + 10 % glycérol	15 / 20 / 30	PEGRX1X2 JCSG ⁺ PACT
Fe-ISCU 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 sans glycérol	7,5 / 15 / 30	Midas PEGRX1X2 PEGII Classics Ammonium Sulfate JCSG ⁺ MbClassII

Tableau 5 Récapitulatif des conditions de cristallisation testées pour Fe-ISCU.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Aucun cristal n'a été obtenu après plus de 2300 conditions testées. La labilité du fer ferreux est peut-être à l'origine de cet échec.

1.7.2 Cristallisation des complexes NIAU et NIAUF avec la forme Fe-ISCU

Nous avons par la suite tenté de cristalliser le complexe avec la forme Fe-ISCU en présence ou absence de FXN. Un récapitulatif des kits utilisés pour la cristallisation de ces complexes est donné dans le **Tableau 6** ci-dessous :

Protéine	Concentration en protéine (mg/mL)	Kit utilisés
NFS1-ISD11-ACP-Fe-ISCU 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 sans glycérol	7,5 / 15 / 30	PEGRX1X2 PEGII MbClassII JCSG+
NFS1-ISD11-ACP-Fe-ISCU- FXN 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 sans glycérol	7,5 / 15 / 30	PEGRX1X2 PEGII MbClassII JCSG+

Tableau 6 Récapitulatif des conditions de cristallisation testées pour le complexe NIAU et NIAUF.

Aucun cristal n'a été obtenu après plus de 1100 conditions testées. Nous avons alors tenté de reproduire les conditions de cristallisation obtenues par l'équipe du Dr. Miroslaw Cygler pour le complexe NIAU avec le mutant ISCU M106I humain contenant du zinc. Les deux meilleures conditions de cristallisation utilisées par cette équipe étaient : (1) 0,1 M MES pH 6,5, 10 % PEG 20 000 ; (2) 0,1 M HEPES pH 7,5, 20 % PEG 8 000. Nous avons alors tenté de cristalliser les complexes NIAU avec Zn-ISCU WT et M106I en criblant des conditions autour de leurs paramètres de cristallisation (pH, quantité de PEG, température). Nous avons également testé le tampon de la protéine source utilisé par cette équipe : 10 mM Bis-Tris, 200 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na₂HPO₄, 5 % glycérol à pH 5,5. Aucuns cristaux n'ont été obtenus malgré cette optimisation.

1.7.3 Microscopie électronique du complexe NIAUF

Suite à nos échecs de cristallisation, nous nous sommes orientés vers la microscopie électronique en collaboration avec l'équipe du Dr Yvain Nicolet à l'institut de biologie Structurale (IBS) à Grenoble. Cette équipe possède un Vitrobot en boîte à gants afin de préparer des grilles de microscopie électronique dans un environnement anaérobie.

Le complexe NIAUF a été reconstitué en incubant de manière stœchiométrique le complexe NIAU en présence de 1,2 équivalents de Fe^{2+} et 2 équivalents de FXN. Ce complexe a été purifié par chromatographie d'exclusion de taille. Le chromatogramme montre 3 pics à 9,8 mL, 10,9 mL et 16,1 mL (**Figure 56a**). Le pic à 16,1 mL correspond à l'excès de FXN. Les pics à 9,8 et 10,9 mL correspondent au complexe et l'analyse par SDS-PAGE a permis de confirmer la présence du complexe NIA, d'ISCU et de FXN dans chacun de ces pics. La présence de deux pics suggère la présence de deux complexes NIAUF différents mais de poids moléculaire très proche. Il est possible que ces deux pics correspondent à des conformations différentes ou bien à l'absence de FXN sur une des deux sous-unités ou encore à l'absence du fer.

Nous avons alors réalisé des grilles de coloration négative sur les deux pics pour visualiser la qualité des échantillons. Les clichés de coloration négative des deux pics révèlent des particules à la taille attendue pour le complexe (**Figure 56b,c**). Cependant, nous pouvons voir des particules de plus grandes tailles (agglomérat) et des particules de plus petites tailles (dissociation du complexe). L'homogénéité de la préparation n'était pas suffisante pour envisager réaliser de la cryo-microscopie électronique. Plusieurs pistes sont envisagées à ce jour afin de rendre la préparation homogène : **(1)** reconstituer le complexe sans passer par une étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille ; **(2)** surexprimer et purifier le complexe en entier chez *E.coli* ; **(3)** utiliser des mutants afin de stabiliser le complexe.

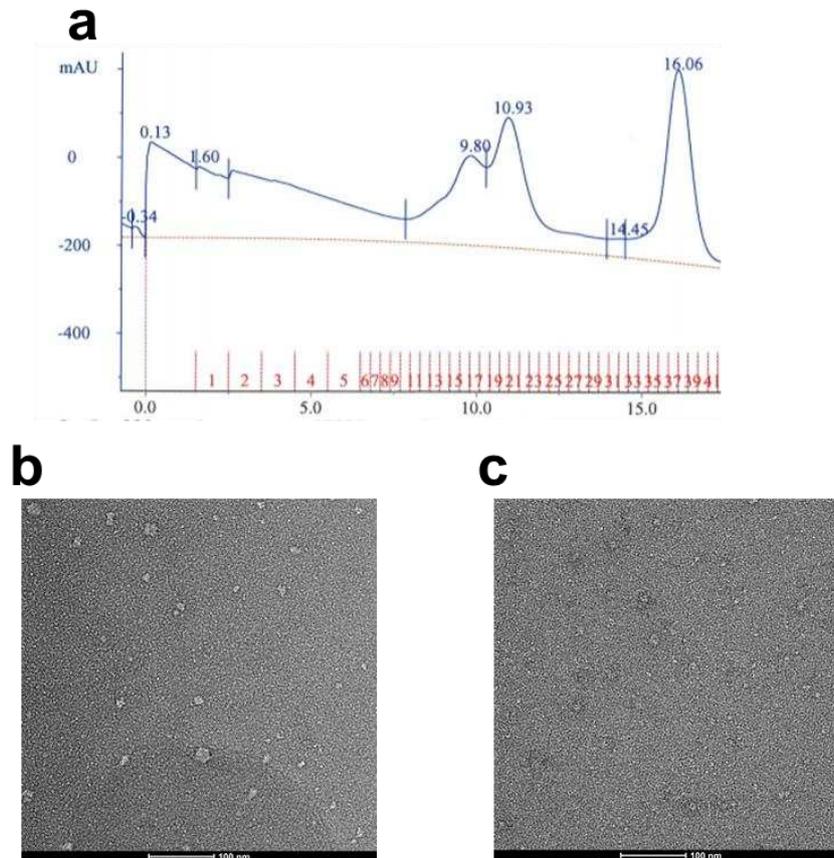


Figure 56 Caractérisation du complexe NIAUF par microscopie électronique. (a) Chromatogramme de la gel filtration obtenue pour le complexe NIAUF. (b-c) Clichés de coloration négative des pics d'élution à 9,8 mL (b) et 10,9 mL (c).

2. Caractérisation structurale de Fe-ISCU, précurseur de l'assemblage des centres Fe-S

2.1 Contexte de l'étude

L'étude de l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie eucaryote nous a permis de mettre en évidence les premières étapes de la séquence menant à la formation du centre binucléaire [2Fe2S]. L'une des étapes clés est l'insertion d'un atome de fer dans ISCU qui va tout d'abord stabiliser la forme structurée de la protéine puis va permettre l'initiation de l'assemblage des centres Fe-S via le transfert d'un persulfure provenant de NFS1. La présence de l'ion fer étant requise pour le transfert de persulfure, il semble que le fer joue un rôle dans le transfert de persulfure, pas uniquement en structurant la protéine puisque la forme apo-ISCU qui se lie à NFS1 sous forme structurée ne peut pas recevoir de persulfure, mais probablement en positionnant de manière adéquate le récepteur du persulfure Cys104 et/ou en « activant » le persulfure. Pour répondre à ces questions nous avons cherché à obtenir une structure du site à fer d'ISCU. En l'absence de succès pour obtenir une structure cristallographique, nous avons entrepris une étude par plusieurs approches spectroscopiques complémentaires (RMN, CD, XAS, RPE,

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Mössbauer) appuyées par la mutagenèse dirigée. Le processus d'insertion du fer posait aussi la question de la séquence de formation du complexe avec NFS1: est-ce que le fer se lie d'abord à apo-ISCU libre puis Fe-ISCU se lie au complexe NIA ou bien apo-ISCU se lie d'abord au complexe NIA puis apo-ISCU lie du fer ? Pour répondre à cette question nous avons étudié l'effet de l'ordre d'ajout des composants de la biosynthèse sur l'assemblage.

Les premières données que nous avons obtenues par spectroscopies CD et Mössbauer et par mutagenèse dirigée suggéraient que le fer est coordonné par Cys35, Asp37, Cys61 et His103, donc dans une coordination identique à celle déterminée par RMN pour le zinc dans ISCU de *M. musculus*. Cependant ces résultats ont été remis en question durant ma thèse par une autre équipe. L'équipe du Dr. Timothy Stemmler a montré par spectrométrie d'absorption aux rayons X (XAS) que les protéines ISCU provenant de *T. maritima*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* et *H. sapiens* étaient capables de lier du fer mais dans un site ne comportant aucun résidu cystéine, uniquement des ligands oxygènes ou azotes, ce qui suggérait la présence d'un second site de fixation au sein d'ISCU (Lewis & al, 2019). De plus, l'équipe du Dr. David P Barondeau a ensuite montré par spectrométrie de masse native que IscU provenant de *E. coli* avait la capacité de fixer 2 atomes de fer (Lin & al, 2020). Cependant ces dernières études avaient été réalisées avec des excès de fer très important par rapport à ISCU (entre 10 et 80 équivalents) qui peuvent conduire à une fixation non-spécifique (Lin & al, 2020).

Dans cette étude, nous avons examiné la fixation du fer par des protéines ISCU provenant de différents organismes aussi bien eucaryotes (*Chaetomium thermophilum*, *H. sapiens*, *M. musculus*) que procaryote (*E. coli*). Nous avons étudié les conditions utilisées par le groupe de T. Stemmler pour comprendre les divergences entre nos deux études.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

2.2 ARTICLE#3: Iron insertion in the assembly site of ISCU scaffold proteins is a conserved process for the initiation of Fe-S cluster biosynthesis

Iron insertion in the assembly site of ISCU scaffold proteins is a conserved process to initiate Fe-S cluster biosynthesis

Batoul Srour,^{1±} Sylvain Gervason,^{1±} Beata Monfort,¹ Djabir Larkem,¹ Nadine Trabelsi,¹ Gautier Landrot,² Andrea Zitolo,² Emiliano Fonda,² Emilien Etienne,³ Guillaume Gerbaud,³ Christina Sophia Müller,⁴ Maren Hellen Hooek,⁴ Jonathan Oltmanns,⁴ Jesse B. Gordon,⁵ Vishal Yadav,⁵ Malgorzata Kleczewska,⁶ Marcin Jelen,⁶ Rafal Dutkiewicz,⁶ David P. Goldberg,⁵ Volker Schünemann,⁴ Bruno Guigliarelli,³ Bénédicte Burlat,³ Christina Sizun,⁷ Benoit D'Autréaux^{1*}

¹ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

² Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, BP48 Saint Aubin 91192, Gif-Sur-Yvette, France

³ Aix Marseille Univ, CNRS, BIP Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, 31 chemin Joseph Aiguier 13402, Marseille, France

⁴ Fachbereich Physik, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Str. 56, 67663 Kaiserslautern, Germany

⁵ Department of Chemistry, The Johns Hopkins University, 3400 N. Charles Street, Baltimore, MD 21218, USA

⁶ Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Abrahama 58, 80-307 Gdansk, Poland

⁷ Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris Saclay, avenue de la terrasse 91190 Gif-sur-Yvette, France

± These authors equally contributed

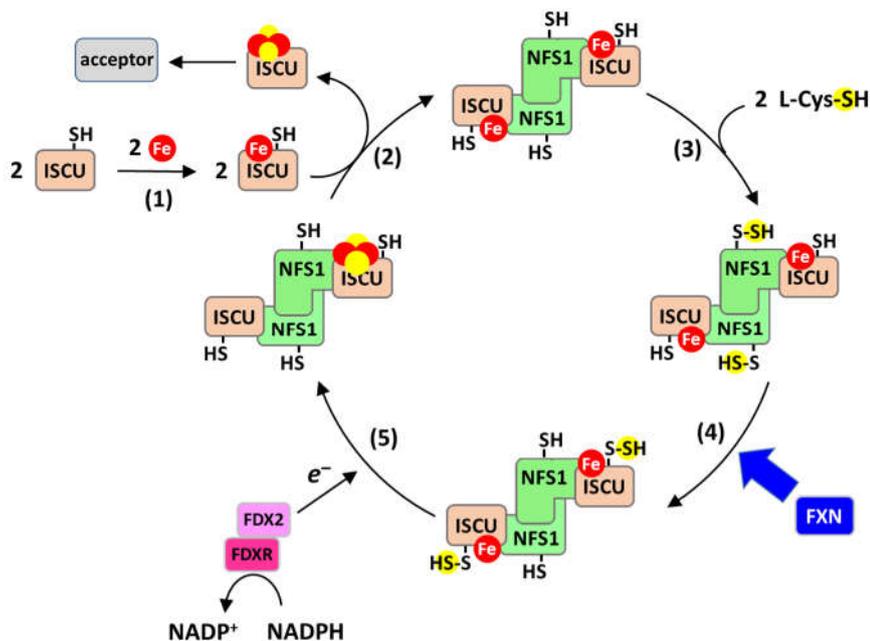
Abstract

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are ubiquitous prosthetic groups of proteins providing catalytic activities to a multitude of enzymes involved in a wide range of biological processes. They are biosynthesized by multi-protein machineries that were highly conserved during evolution, from prokaryotes to eukaryotes. Thereby, the mechanism of their assembly would have been conserved too. Previous studies of the mouse ISC (Iron-Sulfur Cluster) machinery indicated that the first step is the insertion of iron in the assembly site of the ISCU scaffold protein followed by sulfur insertion. However, in ISCU proteins from bacteria, yeast, drosophila and human, iron was found to initially bind at an auxiliary site, thus suggesting species-dependent mechanism of Fe-S cluster assembly. Here we (re)-examined the iron binding properties of several ISCU proteins from both prokaryotic and eukaryotic organisms: bacteria, fungi, mouse and human. We show that the discrepancies on the localization of the iron-binding sites were due to differences in pH and aggregation states of ISCU. We found that all the ISCU proteins accommodated iron in their assembly site with a higher efficiency in their monomeric forms and at pH 8.0. Importantly, the pH studies revealed a direct correlation between the insertion of iron in the assembly site and the Fe-S clusters biosynthetic activity, whereas binding of iron outside of the assembly site, i.e. at the auxiliary site, was not correlated with enzymatic activity. The structural characterizations of the iron center of mouse ISCU at pH 8.0 by CD, NMR, XAS, Mössbauer and EPR spectroscopies, along with site-directed mutagenesis, provided evidence that the iron ion was coordinated by four strictly conserved amino acids of the assembly site: Cys35, Asp37, Cys61 and His103, in a tetrahedral geometry, with the sulfur receptor, Cys104, at very close distance. We further found that Cys104 could swapped with His103, which might facilitate sulfur transfer to Cys104. In conclusion, these extensive biochemical and structural characterizations indicate that iron binding to the assembly site of ISCU is a conserved process across species that initiates Fe-S cluster biosynthesis. Altogether, these data provide the basis to start investigate the structural rearrangements enabling sulfur insertion and subsequent formation of the [2Fe2S] cluster, thus opening new perspectives to unravel the whole mechanism of Fe-S cluster assembly.

Introduction

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are ubiquitous prosthetic groups of proteins, made of iron and sulfide (S^{2-}) ions. The organisms from the three life kingdoms: archaea, prokaryotes and eukaryotes have exploited the versatile properties of Fe-S clusters to perform essential biological functions. This includes ATP production, the Krebs cycle, the synthesis of proteins, DNA and a wide range of metabolites, nitrogen fixation and the maintenance of genome integrity. The most common forms of Fe-S clusters are the generic $[2Fe2S]$ and $[4Fe4S]$ clusters, but more complex Fe-S clusters are found in some specific enzymes such as nitrogenase and hybrid cluster protein. The building block for all these Fe-S clusters is the $[2Fe2S]$ cluster that is biosynthesized *de novo* by multi-protein machineries, which orchestrate a complex multi-step process to assemble iron and sulfur ions in a proper and secured way. Three main machineries have been identified that ensure *de novo* Fe-S cluster biosynthesis: the ISC (iron-sulfur cluster), SUF (sulfur mobilization) and NIF (nitrogen fixation) machineries.¹⁻⁴ The ISC and SUF machineries are general providers of Fe-S clusters while the NIF machinery is dedicated to the assembly of the Fe-S cluster of nitrogenase.^{3,5} The ISC pathway is widespread in eukaryotes and is present in some bacteria while the SUF pathway is mainly present in bacteria, archaea and some eukaryotes, essentially plants.^{1,6-8} The ISC and SUF machineries of eukaryotes were inherited from a bacterial and archaeal ancestor. These pathways thus share strong homologies in all life kingdoms.^{9,10}

Recent works have shed new light on the mechanism of Fe-S cluster assembly by the ISC machinery (**scheme 1**).¹¹⁻¹⁸ This machinery encompasses the scaffold protein ISCU, the NFS1-ISD11-ACP complex containing the cysteine desulfurase NFS1, a pyridoxal-phosphate (PLP) enzyme providing sulfur in the form of a cysteine-bound persulfide (Cys-SSH) by desulfurization of L-cysteine, ferredoxin 2 (FDX2) and its cognate reductase (FDXR), which together deliver electrons to reduce the persulfide, and frataxin (FXN) that stimulates the whole process by accelerating persulfide transfer to ISCU. The process of assembly is initiated by insertion of a ferrous iron ion in ISCU, which triggers the transfer of the persulfide of NFS1 to ISCU. Then, FDX2-FDXR reduces the persulfide into sulfide, which generates a $[2Fe2S]$ cluster by a still ill-defined mechanism that may involve dimerization of ISCU.¹⁵⁻¹⁷ Persulfide transfer and reduction were both shown to require the presence of iron in ISCU, which might synchronize sulfur insertion with iron availability in ISCU for proper assembly of the $[2Fe2S]$ cluster.¹⁵



Scheme 1: Model of Fe-S cluster biosynthesis by the eukaryotic ISC machinery.

This scheme depicts a model of the mechanism of Fe-S cluster synthesis by the eukaryotic ISC machinery with following sequence of elementary steps: (1) Apo-ISCU binds iron, which generates Fe-ISCU, (2) two Fe-ISCU bind to the (NFS1-ISCU)₂ complex (ISCU and NFS1 have been omitted for clarity) by exchange with holo-ISCU containing a [2Fe₂S] cluster and apo-ISCU, (3) within the (NFS1-ISCU-Fe-ISCU)₂ complex, NFS1 reacts with L-cysteine, which generates a persulfide on the catalytic cysteines of both NFS1 subunits, (4) the persulfides on NFS1 are transferred to the Fe-ISCU subunits via a trans-persulfuration reaction and FXN accelerates this step, (5) the persulfides on Fe-ISCU are reduced by FDX2/FDXR into sulfide ions, which ultimately leads to the formation of a [2Fe₂S] cluster, possibly via dimerization of ISCU, and then another catalytic cycle is initiated by the recruitment of two Fe-ISCU.

Although the sequence of Fe-S cluster assembly is becoming clearer, a detailed picture of the underlying mechanism is missing as it is unclear how the iron is coordinated at each stage of the assembly process. The assembly site of ISCU contains five strictly conserved amino acids (aas): Cys35, Asp37, Cys61, His103 and Cys104 (in mouse numbering) that are essential for Fe-S cluster biogenesis *in vivo*.¹⁹⁻²² The strict conservation of these aas suggests that the mechanism of assembly is conserved across species.^{23,24} Among them, Cys104 was identified as the persulfide receptor in mouse ISCU,^{15,16} and the [2Fe₂S] cluster is ligated by Cys35, Asp37, Cys61 and Cys104 at the ultimate stage of the assembly process.²⁵⁻²⁹ Few data on the coordination changes occurring during the reaction process have been reported. Most of these data arises from ISCU proteins containing zinc instead of iron (thereafter designed Zn-ISCU). Since zinc can functionally replace iron to enable persulfide transfer and its acceleration by FXN (**scheme 1**, reaction 4), it appears as a relevant surrogate to build mechanistic models of the early steps of the reaction.¹⁵ However, different coordination arrangements have been reported for the zinc ion at the initial stage (**scheme 1**, reaction 1). In mouse Zn-ISCU (PDB code 1WFZ), the zinc ion is coordinated by Cys35, Asp37, Cys61 and His103, while in *H. influenzae* Zn-ISCU (PDB code 1RP9),³⁰ Asp37 is free and Cys104 becomes a ligand. The substitutions of Asp39 and His105 by alanine in *E. coli* IscU indicate that both retain their ability to bind zinc with similar affinities,

which suggests that several configurations might be in equilibrium.³¹ In complex with NFS1-ISD11-ACP (PDB code 5WGB), the arrangement of the zinc center of human ISCU is similar to mouse Zn-ISCU, except that Cys35 is exchanged by the catalytic cysteine of NFS1, most likely to promote persulfide transfer.¹¹ Remarkably, Cys104 is not a ligand in the structures of both mouse Zn-ISCU and human NFS1-ISD11-ACP-Zn-ISCU complex, but it remains very close to the zinc ion, at 3.9 Å and 3.6 Å, respectively, which might be important for persulfide transfer. Interestingly, FXN modifies the coordination sphere of the zinc center.¹⁴ Binding of FXN to the human NFS1-ISD11-ACP-Zn-ISCU complex (PDB code 6NZU), was shown to push aside Cys35 and His103 while Cys104 became a ligand, possibly to facilitate persulfide transfer to Cys104. Altogether, these data point to an intrinsic structural flexibility of the metal binding-site that is most likely critical to enable persulfide transfer (**scheme 1**, reaction 4), its reduction and the subsequent accommodation of the [2Fe2S] cluster (**scheme 1**, reaction 5). The structural flexibility of the metal center is linked to the localization of its ligands that belong to distinct secondary elements of the ISCU protein, which come together upon metal binding.³⁰⁻³² Indeed, ISCU exists in two interconverting forms in solution, a structured (S) and a disordered (D) one, and binding of a metal ion (zinc or iron) stabilizes the S state.^{15,31,32} The overall structural flexibility of ISCU thus allows remodeling of the assembly site during Fe-S cluster assembly.

Few data have been reported for the iron-containing form of ISCU (Fe-ISCU).^{15,33-35} Based on circular dichroism (CD) and Mössbauer spectroscopies, we reported that the ferrous iron initially binds to a cysteine-rich site in mouse ISCU, which we identified as the assembly site.¹⁵ Site-directed mutagenesis showed that the substitutions of Cys35, Cys61 and Asp37 totally abolished iron binding to the assembly site, which corroborated the idea that iron binds to the assembly site. However, this model was challenged by other studies.³³⁻³⁵ Analysis by X-ray absorption (XAS) spectroscopy of ISCU proteins, both prokaryotic and eukaryotic (*Thermotoga maritima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*), indicated that iron binds to an alternative site containing exclusively nitrogen and oxygen ligands. These data suggested that initial binding of iron at the alternative site is possibly a conserved feature across species. Moreover, binding of a second iron to *Escherichia coli* IscU was reported by native mass spectrometry, thus opening the possibility that ISCU proteins could host a binuclear iron center.³⁶ These data raise important questions about the ubiquitous character of the mechanism described for mouse ISCU.

We have thus re-examined this model by analyzing the iron binding properties and Fe-S cluster assembly activities of a panel of prokaryotic and eukaryotic ISCU proteins. Here we show that ISCU proteins from the bacterium *Escherichia coli*, the fungus *Chaetomium thermophilum* and the mammals *Mus musculus* and *Homo sapiens* bind iron in the assembly site and are functional for Fe-S cluster assembly in a physiologically relevant assay including the reductase system FDX2-FDXR. We found that iron insertion is sensitive to pH, the nature of the buffer and the oligomeric state of the protein, which explains why other groups failed to observe insertion of iron in the assembly site. Finally, we

provide the first structure of the iron center in the assembly site based on analysis of mouse ISCU by site directed mutagenesis, CD, NMR, XAS, EPR and Mössbauer spectroscopies. These data provide an array of evidence that Fe-S cluster biosynthesis is initiated by insertion of a ferrous iron in the assembly site of ISCU, which appears to be a conserved process from prokaryotes to eukaryotes.

Results and discussion

Monomeric ISCU proteins bind iron in the cysteine-containing site and are functional for Fe-S cluster biosynthesis

We first assessed the iron-binding abilities of a series of ISCU proteins from prokaryotic and eukaryotic organisms: *E. coli* (Ec), *C. thermophilum* (Ct), *M. musculus* (Mm) and *H. sapiens* (Hs). As previously reported, ISCU proteins expressed in bacteria co-purify with zinc in the assembly site that needs to be removed to enable iron insertion.¹⁵ To get rid of zinc, the ISCU proteins were incubated with DTPA and then re-purified by size exclusion chromatography (SEC). The SEC chromatograms revealed the presence of two species. One eluted at 45 mL (about 20% of ISCU) and a lighter one eluted between 65 and 85 mL (about 80% of ISCU) corresponding to apparent molecular weights of 2000-5000 kDa and 10-20 kDa, consistent with oligomeric and monomeric apo-ISCU, respectively (**Fig. 1a**). We then assessed the ability of monomeric ISCU proteins to bind iron in the assembly site using circular dichroism (CD) to detect specific Cys \rightarrow Fe^{II} ligand to metal charge transfer (LMCT) bands that are expected in the 250 - 350 nm region. All the monomeric apo-ISCU proteins incubated with one equivalent of ferrous iron displayed the typical LMCT bands indicating that iron was inserted in the assembly site of these proteins (**Fig. 1b**).

These results are in agreement with our previous work showing that *Mm* apo-ISCU binds one iron in the assembly site,¹⁵ but they are in contradiction with the results reported for ISCU proteins from *T. maritima*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* and *H. sapiens* indicating that iron does not bind to the cysteine-rich assembly site but to another site without any cysteine (thereafter designed as the non-cysteinyll site).³³⁻³⁵ We thus aimed to clarify this discrepancy by testing iron insertion under the same conditions as the Stemmler group. We noticed that in these studies, monomeric apo-ISCU proteins were prepared in HEPES buffer at pH 7.0, while we used Tris buffer at pH 8.0. Moreover, the apo-ISCU proteins were stored at 4°C in the anaerobic chamber and submitted to several concentration/dilution cycles before addition of iron for XAS analysis, which might have favored accumulation of oligomerized ISCU. In contrast, our procedure includes a limited number of concentration steps and the protein was stored in the frozen state to prevent formation of oligomers. We thus tested the effect of pH and the oligomerization state on iron insertion. We found that iron binding to the assembly sites of ISCU was sensitive to pH, with about 75 % and 65 % decreased iron content from pH 8.0 to 7.0 in *Mm* and *Ec* ISCU, respectively (**Fig. 1c**). Iron binding was also impacted by the nature of the buffer with phosphate being less efficient than HEPES and Tris (**Fig. 1c**). After several concentration/dilution cycles, iron binding to *Mm* apo-ISCU at pH 7.0 was further diminished compared to the monomeric form (**Fig. 1d**). This suggests that the concentration/dilution cycles promote formation of oligomerized ISCU that is less efficient to bind iron. Indeed, iron binding to oligomerized *Mm* apo-ISCU was strongly diminished at pH 8.0 and totally abolished at pH 7.0 (**Fig. 1d**). Altogether, these data point to critical

influences of the pH, the nature of the buffer and the oligomeric state of ISCU on the efficiency of iron insertion in the assembly site of ISCU, which could explain iron binding to the non-cysteinylyl site previously reported at pH 7.0 and under conditions favoring the formation of oligomers.

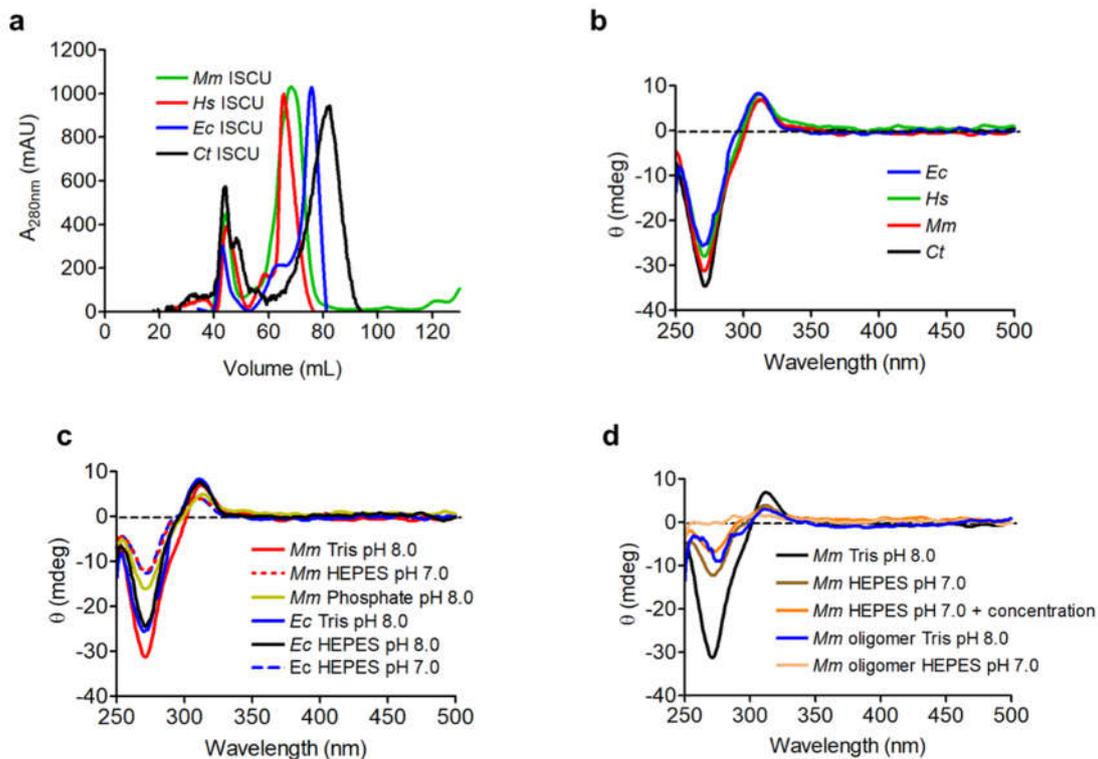


Figure 1: Effect of oligomerization and pH on iron insertion in selected ISCU proteins (a) Size exclusion chromatograms of *Ec*, *Ct*, *Mm* and *Hs* apo-ISCU proteins. (b) CD spectra of *Ec*, *Ct*, *Mm* and *Hs* apo-ISCU proteins incubated with one equivalent of iron. (c) CD spectra of monomeric *Mm* and *Ec* apo-ISCU prepared in buffers Tris pH 8.0, HEPES pH 7.0 and phosphate pH 8.0 and incubated with one equivalent of iron. (d) CD spectra of monomeric and oligomeric *Mm* apo-ISCU prepared in Tris pH 8.0, HEPES pH 7.0 and after 5 cycles of concentration/dilution in HEPES pH 7.0, incubated with one equivalent of iron.

This pH dependency of iron binding in ISCU raised the question of the physiological relevance of the two sites, assembly and non-cysteinylyl, for Fe-S cluster biosynthesis depending on the internal pH of each organism. In eukaryotes, the ISC machinery is located in the matrix of mitochondria where the pH is maintained around ~ 8.0 .^{37,38} Bacteria are exposed to larger pH variations depending on their habitat. *E. coli* strains colonize the intestine (small intestine and colon) where the pH is ranging from 6.0 to 8.5. They are able to maintain their intracellular pH between 7.0 and 8.0.³⁹⁻⁴² We thus examined the efficiency of the Fe-S cluster assembly reaction in the 7.0 - 8.0 pH range. We first tested the ability of the iron-loaded forms of *Ec*, *Ct*, *Mm* and *Hs* ISCU proteins to assemble Fe-S cluster at pH 8.0 in Tris buffer, by reconstituting their corresponding ISC machineries, which include the NFS1-ISD11-ACP complex, FDX2, FDXR and frataxin (FXN) for *Ct*, *Mm* and *Hs* Fe-ISCU and IscS, Fdx and FdxR for the *Ec* Fe-IsCU. Since Fe-S clusters can also be assembled via a non-physiological route in the absence of the reductase systems (FDX2-FDXR and Fdx-FdxR), we also monitored the rates of Fe-S cluster assembly in the absence of these systems to assess the physiological relevance of these reconstitutions.¹⁵

In the presence of the complete ISC machineries, all the Fe-ISCU proteins supported Fe-S cluster assembly (**Fig. 2a, +Fdx**) and at comparable rates, while in the absence of the FDX2-FDXR / Fdx-FdxR reductase system, the reactions were strongly impaired (**Fig. 2a, -Fdx**). This indicated that the Fe-S cluster reconstitutions with the whole ISC machineries were physiologically relevant.

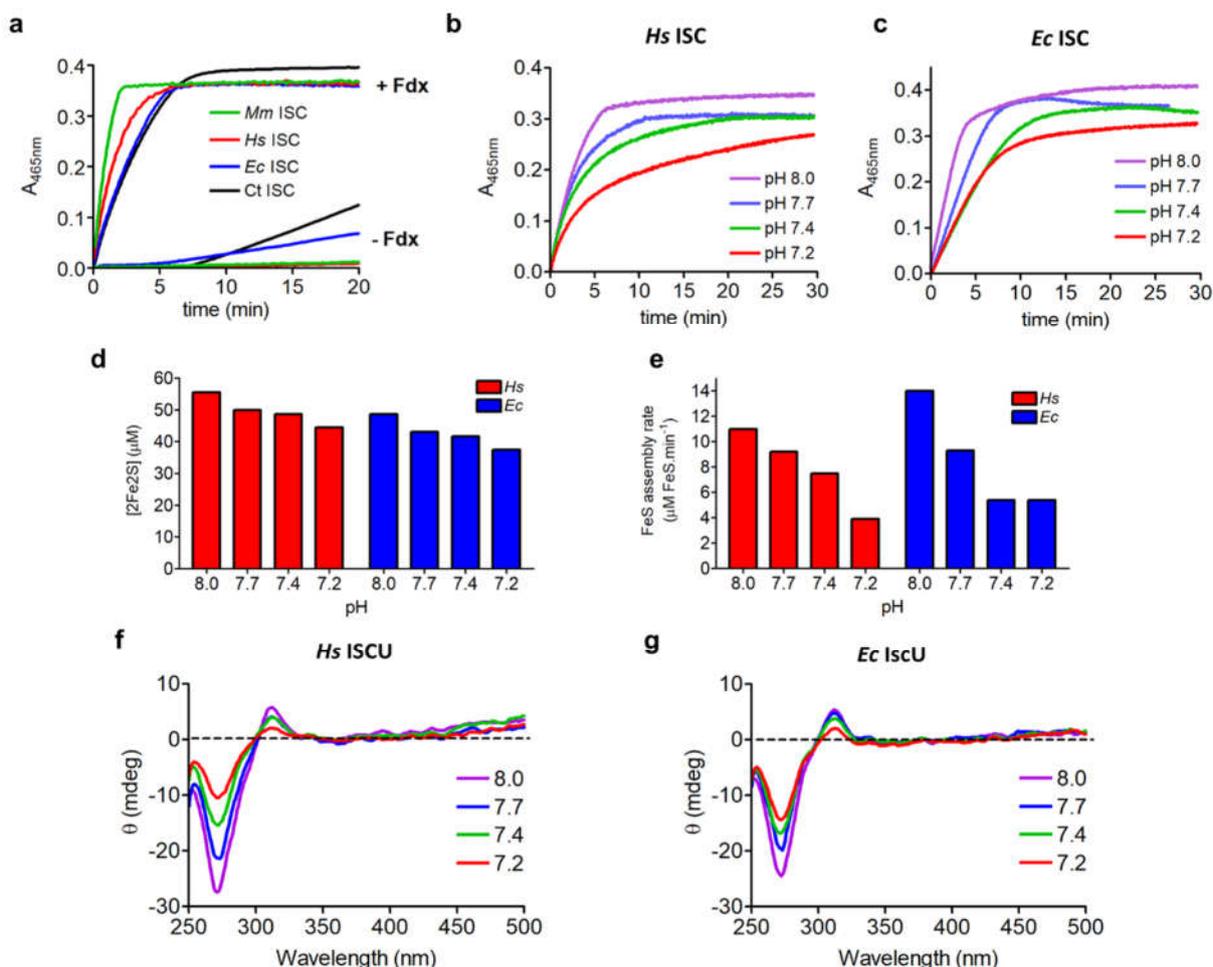


Figure 2: Effect of pH on Fe-S cluster assembly by selected ISC machineries

(a) Fe-S cluster assembly assays of monomeric *Ec*, *Ct*, *Mm*, *Hs* with their corresponding ISC machineries in reactions containing (+ Fdx) and lacking (- Fdx) Fdx and FdxR. The mouse ISC machinery was used for *Ct* ISC. (b, c) Fe-S cluster assembly assays of the *Hs* (b) and *Ec* (c) ISC machineries at different pH (8.0, 7.7, 7.4, 7.2). (d, e) Plot of the final yield in [2Fe2S] clusters (d) and rate of Fe-S cluster assembly (e) at different pH of the reactions presented in b and c. (f, g) CD spectra of monomeric *Hs* (f) and *Ec* (g) apo-ISCU prepared in Tris buffer at pH 8.0, 7.7, 7.4 and 7.2 and incubated with one equivalent of iron.

We next investigated the effect of pH on two ISC machineries, *Hs* and *Ec* ISC, as representatives of prokaryotic and eukaryotic organisms. As the pH decreased, both the *Hs* (**Fig. 2b**) and *Ec* (**Fig. 2c**) ISC machineries were less efficient. Two main features of the kinetics were affected: the yield in [2Fe2S] clusters that is estimated by measuring the value of the plateau at the end of the reaction and the initial rate of Fe-S cluster synthesis. The yields in [2Fe2S] clusters were decreased by about 20 % for both machineries after 30 minutes of reaction from pH 8.0 to 7.2 (**Fig. 2d**). This decrease is lower than the ~ 60-65 % initial loss of iron inserted from pH 8.0 to 7.2 in *Hs* (**Fig. 1f**) and *Ec* (**Fig. 1g**) ISCU,

but equilibrium might favor iron insertion as the reaction proceeds. A more prominent effect of pH was observed on the rate of assembly with decreases of about 70 % for both, the *Hs* and *Ec* ISC machineries, from pH 8.0 to 7.2 (**Fig. 2e**). Although other steps of the Fe-S cluster assembly reaction might be sensitive to pH, such as persulfide transfer and reduction (**scheme 1** reaction 4 and 5), the similar effects of pH on iron insertion and Fe-S cluster assembly suggest that iron insertion at the assembly site, but not at the non-cysteiny-site, is correlated with a more efficient assembly reaction.

Paramagnetic NMR shows that iron binds to the assembly site of *Mm* Fe-ISCU

We focused on *Mm* ISCU to provide a structural characterization of the assembly site. We first analyzed *Mm* Fe-ISCU by NMR to localize the iron-binding site within the structure of ISCU, by mapping the perturbations induced by the Fe^{II} center on the 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of ISCU. The paramagnetic state of the Fe^{II} center ($S = 2$) results in signal broadening in the proximity of the paramagnetic center, due to paramagnetic relaxation enhancement (PRE).⁴³ For more distant atoms, PRE decreases and signals can be observed. When compared to a diamagnetic reference, these signals display chemical shift perturbations corresponding to pseudo-contact shifts (PCSs). PCSs are sensitive to the distance to the paramagnetic center and to the orientation with respect to the paramagnetic susceptibility tensor.⁴⁴ To assess PCS perturbations in Fe-ISCU we used zinc loaded ISCU (Zn-ISCU) as a diamagnetic reference.

The ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of Zn-ISCU was assigned (104 out of 129 amide signals) using standard three-dimensional NMR experiments (**Fig. 3a**, red contours). We then analyzed apo-ISCU incubated with one molar equivalent of Fe²⁺ (**Fig. 3a**, blue contours). ISCU is a metamorphic protein that exists in solution in two states, a structured (S) and a disordered (D) one, that are in equilibrium.^{31,32} The binding of iron in the assembly site stabilized the S state as demonstrated by the overall signal dispersion, equivalent to that induced by zinc binding (**Fig. 3a**).¹⁵ The broad signal in the center of the spectrum showed that about ~20 % of ISCU was still in the D state. Several signals disappeared due to PRE that were attributed to residues binding the iron ion or very close to it. ISCU residues with large line broadening included the strictly conserved residues binding zinc in the assembly site and the residues next to them (Ala32-Val38, Thr58-Ala71, Lys101-Asp110) (**Fig. 3b**). Other weak signals were shifted with respect to Zn-ISCU due to PCSs that corresponds to more distant residues. As PCSs are nearly the same within an amide pair, chemical shift perturbations of the ¹H and ¹⁵N nuclei can be visualized as diagonal lines in the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum (**Fig. 3a**), facilitating assignment transfer: 77 out of 129 amide signals were assigned for iron-loaded ISCU by this means. Residues displaying PCSs and attenuated PRE were in the vicinity of the zinc ligands, but more distant from the paramagnetic center. We then mapped Fe²⁺ binding by plotting PREs and PCSs on the structure of *Mm* Zn-ISCU (**Fig. 3c**). Taken together these results indicate that Fe²⁺ binds to ISCU by occupying the Zn-binding site in the structured state of ISCU. However, our NMR experiments could not indicate whether the

coordination of the Fe^{2+} ion was the same as for the Zn^{2+} ion in this site (Cys35, Asp37, Cys61 and His103). We thus examined the structure of the iron site of Fe-ISCU with complementary methods (XAS, EPR, Mössbauer).

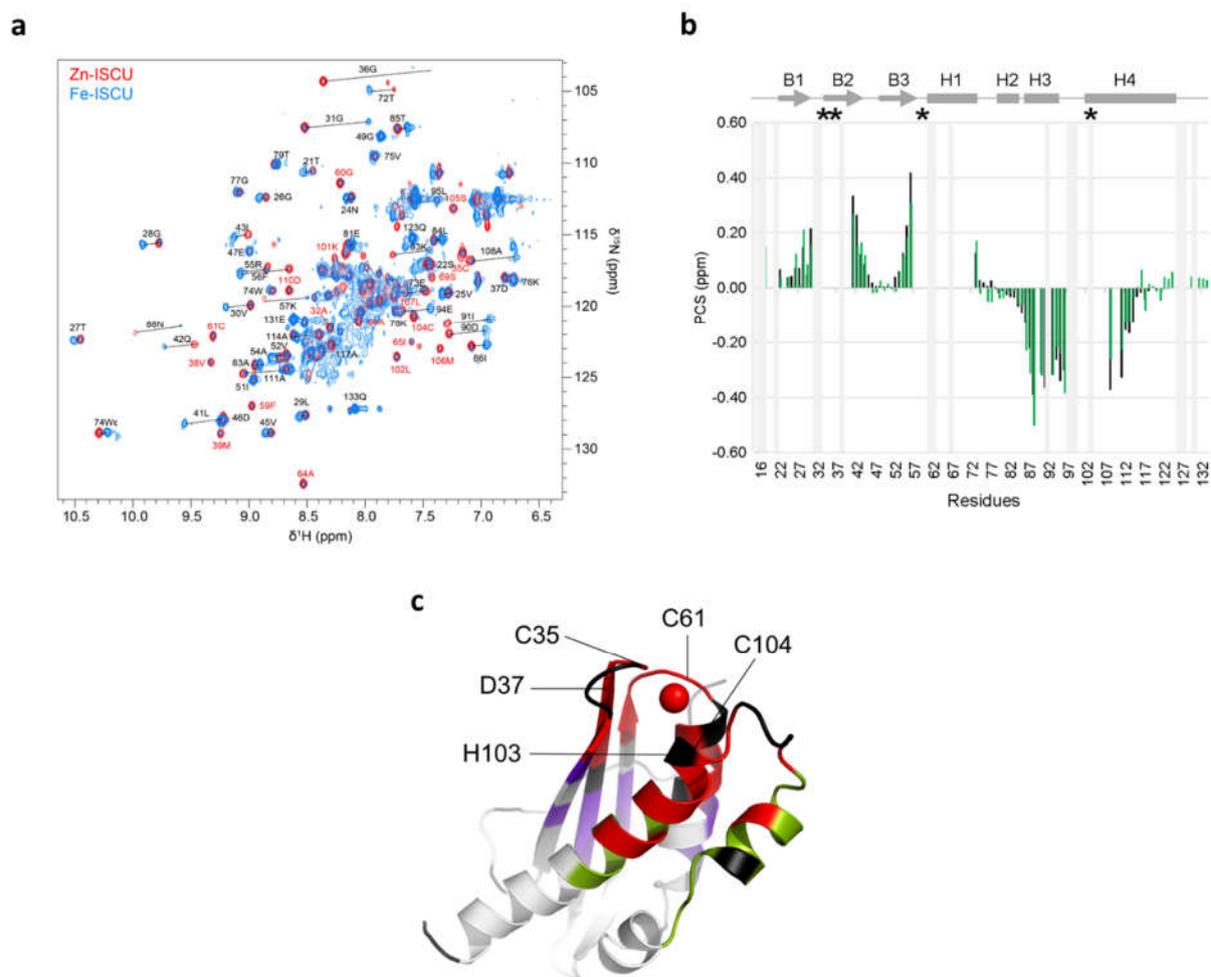


Figure 3: Mapping of the Fe^{2+} binding site in *Mm* Fe-ISCU by NMR

(a) Superimposed ^1H - ^{15}N HSQC spectra of Zn-ISCU (red contours) and Fe^{2+} -loaded ISCU (blue contours). Amide assignments are indicated for notable signals. Signals broadened out by PRE are labelled in red. PCSs are indicated by diagonal lines connecting Zn-ISCU and Fe-ISCU signals. (b) Chemical shift perturbations were measured for observable signals in Fe-ISCU versus Zn-ISCU in both ^1H (black) and ^{15}N (green) dimensions. Grey zones correspond to unassigned or proline residues in the Zn-ISCU form. The topology of ISCU taken from the *Mm* Zn-ISCU structure (PDB code 1WFZ) and the position of Zn-coordinating residues (black stars) are indicated on top. (c) Structural model mapping the Fe^{2+} binding site on the structure of *Mm* Zn-ISCU. The structure of *Mm* Zn-ISCU (PDB code 1WFZ), shown in cartoon, was used to map the Fe^{II} -induced chemical shift perturbations and PRE on a per residue basis. Residues that could not be assigned in Zn-ISCU are colored in black. Residues with strong PRE (complete signal broadening), negative PCS (< -0.1 ppm) and positive PCS (> 0.1 ppm) are colored in red, green and purple, respectively. The positions of Zn (red sphere) and of the 5 invariant residues of the assembly site (Cys35, Asp37, Cys61, His103 and Cys104) are indicated.

Characterization of the iron-binding site of *Mm* ISCU by XAS spectroscopy

Following NMR results, we implemented Fe K-edge X-ray absorption spectroscopy to investigate the structure of the iron center of *Mm* Fe-ISCU. Apo-ISCU was incubated with 0.7 equivalent of iron to ensure that the iron was exclusively present in the assembly site. We first analyzed the EXAFS

domain of the XAS spectrum (**Fig. 4a, 4b and Table 1**). By setting all parameters free, the fits yielded an average number of four coordinating atoms: two nitrogen/oxygen and two sulfurs (**Table 1, fit #1**). Since, the assembly site of ISCU encompasses three cysteine, one aspartate and one histidine, we also performed a series of fits in which the number and the nature of backscattering atoms was constrained to test combinations of three, four and five sulfurs (S) and nitrogen/oxygen (N/O) donating atoms (**Table 1, fits #2 to #9**). We also included fits with exclusively N/O atoms to test the possibility that iron binds to the alternative site. The best fit (**fit #5**) was obtained with four coordinating atoms, two N/O centered at 2.05 Å and two S centered at 2.34 Å. The nature, number and distances of the coordinating atoms were identical to those obtained with the fit performed by leaving all the parameters floating (**fit #1**). This strengthens the EXAFS analysis with only four coordinating atoms, two N/O and two S.

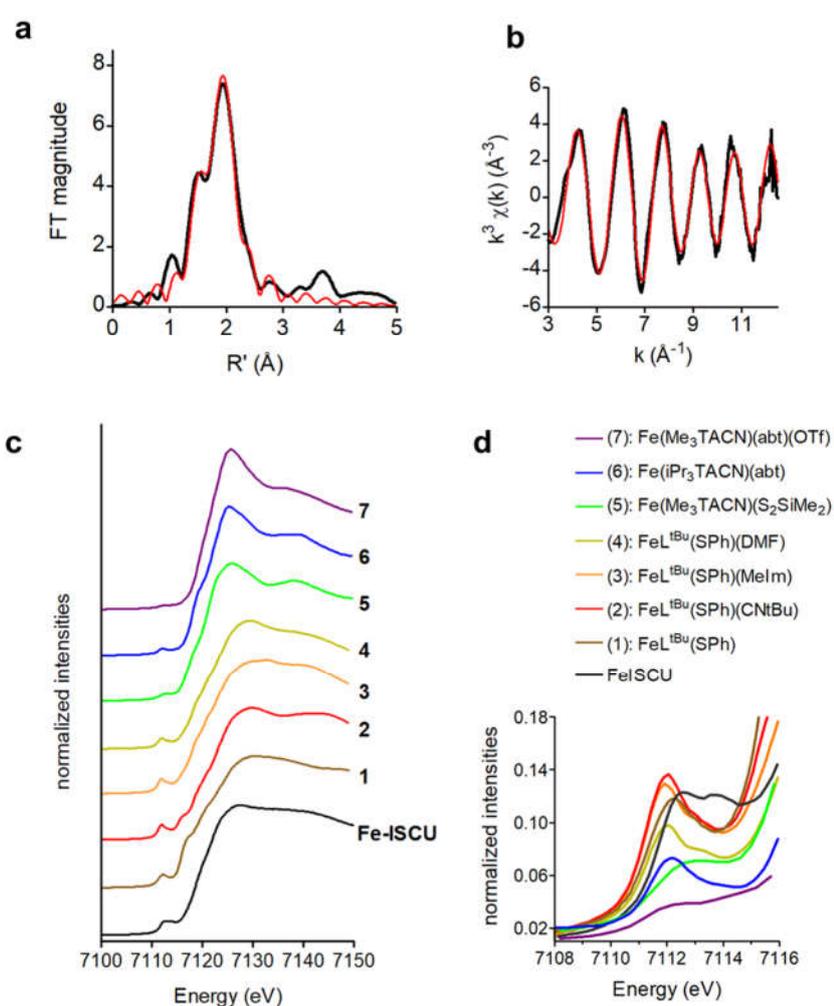


Figure 4: XAS spectra at the Fe-K edge of Fe-ISCU and model compounds.

(a, b) Fourier transform (a) and unfiltered EXAFS spectrum (b) of Fe-ISCU (over a k range of 3 to 13 Å^{-1}). Experimental data, black lines; simulation data, red lines. Fit parameters are reported in Table 1 (Fit #1). (c, d) Normalized XANES spectra (c) and expansion of the pre-edge region (d) for Fe-ISCU and the model compounds $\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}^{\text{tBu}}(\text{SPh})$ (1) $\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}^{\text{tBu}}(\text{SPh})(\text{CNtBu})$ (2), $\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}^{\text{tBu}}(\text{SPh})(\text{MeIm})$ (3), $\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}^{\text{tBu}}(\text{SPh})(\text{DMF})$ (4), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Me}_3\text{TACN})(\text{S}_2\text{SiMe}_2)$ (5), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{iPr}_3\text{TACN})(\text{abt})$ (6), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Me}_3\text{TACN})(\text{abt})(\text{OTf})$ (7) (see **supplementary Fig. S1** for structures).

Table 1: Parameters from EXAFS fits of Fe-ISCU

CN, total number of backscattering atoms, ^a shell containing absorber: Fe (iron) and backscattering atoms: N (nitrogen), O (oxygen), S (sulfur). ^b number of backscattering atoms set as a free parameter for fit #1 (the standard deviation of the last digit is indicated in brackets) and fixed for fits #2 to #9. ^c average Debye–Waller factor $\times 10^3 \pm 0.1$. ^d average Fe-backscatter distance ± 0.04 Å. ^e R-factor indicating goodness of fit (see methods for EXAFS fits).

Fit #	CN	Shell ^a	N ^b	σ^2 (Å ²) ^c	R (Å) ^d	R-factor ^e
1	4	Fe-O/N	2.0 (5)	4.1	2.05	0.020
		Fe-S	2.1 (5)	2.4	2.34	
2	3	Fe-O/N	2	1.5	2.09	0.150
		Fe-S	1	0.9	2.35	
3	4	Fe-O/N	3	4.2	2.10	0.190
		Fe-S	1	2.4	2.35	
4	4	Fe-O/N	1	9.1	2.04	0.049
		Fe-S	3	5.2	2.33	
5	4	Fe-O/N	2	4.1	2.05	0.019
		Fe-S	2	2.4	2.34	
6	5	Fe-O/N	3	5.8	2.07	0.050
		Fe-S	2	3.2	2.34	
7	5	Fe-O/N	2	9.1	2.04	0.043
		Fe-S	3	5.2	2.33	
8	6	Fe-O/N	1	1.1	2.01	0.250
		Fe-O/N	5	3.4	2.19	
9	6	Fe-O/N	2	2.0	2.01	0.220
		Fe-O/N	4	1.7	2.19	

We next analyzed the XANES spectrum of Fe-ISCU and a series of structurally characterized Fe^{II} model compounds, with coordination spheres including sulfurs to provide the most relevant comparisons with Fe-ISCU (**Fig. 4c, 4d, Table 2, supplementary Fig. S1, S2**). The XANES spectrum of Fe-ISCU displayed two pre-edge peaks at 7112.3 eV and 7113.5 eV attributed to 1s→3d transitions and shoulders on the rising edge between 7115 – 7125 eV, attributed to 1s→4p transitions (**Fig. 4c, 4d, Table 2**). Strikingly, the overall shape of the XANES spectra of Fe-ISCU exhibited strong similarities with 3- and 4-coordinated tetrahedral complexes, with a smooth maximum between 7125 – 7130 eV, while 5- and 6-coordinated complexes were characterized by a more prominent maximum in this region. This suggested that the Fe^{II} center of Fe-ISCU is rather 3- or 4-coordinated. The intensity and the energy of the pre-edge transitions are usually good indicators of the number of ligands, the geometry and the nature of the coordinating atoms. The dipole allowed 1s→3d transitions gain intensity through hybridization of the 3d (*t_{2g}*) orbitals with the overlying 4p orbitals, which relies on the non-centrosymmetric character of the ligand field.⁴⁵⁻⁴⁸ Thereby, tetrahedral complexes display more intense pre-edge features than trigonal pyramid, square planar and octahedral ones.⁴⁵⁻⁴⁸ The value of the integrated area under the pre-edge peaks of Fe-ISCU was much higher than 5- and 6-coordinated complexes as well as 4-coordinated square planar centers but fell into the range of 4-coordinated tetrahedral Fe^{II} complexes (**Table 2**). The energy of the 1s→3d transitions is also sensitive to the covalency of the metal-ligand bond. As sulfurs establish more covalent bond than nitrogen and oxygen, one would expect that the energy increases with the number of sulfurs. Indeed, the plot of the energy of

the first pre-edge peak against the number of sulfurs provided a relatively good correlation in the series of 4-coordinated tetrahedral Fe^{II} complexes (**Supplementary Fig. S3**). Thereby, the value for Fe-ISCU was indicative of the presence of two or three sulfurs coordinating the Fe^{II} center, which was consistent with the EXAFS data.

In conclusion, the analysis of the XANES spectrum corroborated and complemented the EXAFS analysis, which together indicated that the Fe^{II} center in Fe-ISCU is 4-coordinated in a distorted tetrahedral geometry, by two sulfurs and two nitrogen/oxygen ligands. This set of ligands is consistent with a coordination by two cysteines and two aspartate or histidine residues, as earlier proposed based on site directed mutagenesis.¹⁵

Table 2: Pre-edge parameters for Fe-ISCU and selected 3-, 4-, 5- and 6-coordinated Fe^{II} model compounds. ^a C.A., coordinating atoms. ^b standard deviation of $\pm 3.5\%$. See Methods and **supplementary Fig. S2** for fits of XANES data for Fe-ISCU and complexes (5-7).

Sample	Geometry	C.A. ^a	Pre-edge peaks 1s \rightarrow 3d (eV)	Pre-edge area $\times 10^2$ (Å ²)	Ref
FeISCU		2S, 2N/O	7112.3 ; 7113.7	25.2 ^b	This work
3-coordinated complexes					
FeL ^{tBu} (SPh) (1)	D3h	1S, 2N	7112.2	23.4	45
4-coordinated complexes					
Rubredoxin AlKG	Td	4S	7112.8	17.5	49
[Fe(SPh) ₄] ²⁻	Td	4S	7112.5	30	50
[Fe ₂ (bis(benzimidazolato) ₂ S ₂) ⁴⁻	Td	2S, 2N	7112.1	25	48,51
FeL ^{tBu} (SPh)(CNTBu) (2)	Td	1S, 1C, 2N	7111.9 ; 7113.4	28.3	45
FeL ^{tBu} (SPh)(MeIm) (3)	Td	1S, 3N	7111.9 ; 7113.2	23.5	45
Fe(HB(3,5- <i>i</i> -Pr ₂ pz) ₃ (SC ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂))	Td	1S, 3N	7111.5	21	46
FeL ^{tBu} (SPh)(DMF) (4)	Td	1S, 2N, 1O	7111.9 ; 7113.4	18.9	45
Fe(HB(3,5- <i>i</i> -Pr ₂ pz) ₃ (OC ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl))	Td	3N, 1O	7111.5	18.5	46
Gillespite (BaFeSi ₄ O ₁₀)	D4h	4O	7111.7 ; 7113.2	5.3	47
Fe(HB(3,5- <i>i</i> -Pr ₂ pz) ₃)Cl	Td	3N, 1Cl	7111.6 ; 7113.2	20	47
[FeCl ₄] ²⁻	Td	4Cl	7111.6 ; 7113.1	13	47
5-coordinated complexes					
Fe(Me ₃ TACN)(S ₂ SiMe ₂) (5)	C4v	2S, 3N	7112.6 ; 7113.8	10.3 ^b	This work, ^{52,53}
[Fe(TMCS)] ⁺	C4v	1S, 4N	7112.5 ; 7114.4	13.6	54
[Fe(<i>i</i> Pr ₃ TACN)(abt)] ⁺ (6)	C4v	1S, 4N	7112.1 ; 7113.7	12.1 ^b	This work, ⁵⁵
[Fe(TPA)(S-2,4,6-Me ₃ C ₆ H ₂)] ⁺	C3v	1S, 4N	7112	8.9	46,56
[Fe(TMCSO ₂)] ⁺	C4v	4N, 1O	7112.6	13.4	54
Fe(HB(3,5- <i>i</i> -Pr ₂ pz) ₃ (OBz))	C3v	3N, 2O	7112	10.7	46
[Fe ₂ (OBz)(et-HPTB)] ²⁺	D3h	3N, 2O	7111.7 ; 7113.4	13	47
6-coordinated complexes					
Fe(Me ₃ TACN)(abt)(OTf) (7)	Oh	1S, 4N, 1O	7112.1 ; 7114	6.4 ^b	This work, ⁵⁵
IPSN + ACV	Oh	1S, 2N, 3O	7112 ; 7118	12	57
IPSN	Oh	2N, 4O	7112	8	57
[Fe ₂ (salmp) ₂] ²⁻	Oh	2N, 4O	7111.4 ; 7113.6	5	47

Identification of the protein ligands of the Fe^{II} center by site directed mutagenesis combined to Mössbauer, CD and EPR spectroscopies

We previously used site directed mutagenesis along with Mössbauer and circular dichroism spectroscopies to identify the ligands of the iron center in *Mm* ISCU.¹⁵ These analyses suggested that the iron is coordinated by Cys35, Cys61, Asp37 and His103, while Cys104 is free, which is consistent with a 2S, 2N/O set of donating atoms determined here by XAS spectroscopy. The mutants of Cys35, Cys61 and Asp37 were shown to totally abolish iron binding to the assembly site, thus strongly supporting the conclusion that these aas are ligands of the metal center. The C104S mutation was shown to decrease the affinity of ISCU for iron, which suggested that Cys104 might be ligating or close to the Fe^{II} center in the assembly site.¹⁵ Conversely, the Mössbauer parameters were not affected by the mutation, thus suggesting that Cys104 is not a ligand (**Table 3**). The Mössbauer analysis revealed the presence of two different species (**Table 3**, S₁ and S₂). The parameters of the main species (S₁, 63 %) were identical to those of iron in the assembly site of WT ISCU within the margin error. Therefore, the Mössbauer analysis were not supporting the idea that Cys104 is ligating or even interacting with the iron center. However, we could not definitely conclude on the effect of the C104S mutation due to the presence of the other species (S₂, 37 %) with parameters indicative of a site without cysteine ($\delta = 1.23 \text{ mm.s}^{-1}$).¹⁵ Puzzling results were also obtained with the mutant of His103 into alanine (H103A).¹⁵ This mutant displayed CD absorptions attributed to the characteristic Cys \rightarrow Fe^{II} LMCT transitions. Although the intensities of these absorptions were much weaker than in the WT protein, these data suggested that iron still binds to the assembly site of the mutant, albeit weakly. However, we could not detect any species with sulfur donating atoms by Mössbauer spectroscopy. This prompted us to re-examine the C104S and H103A mutants of *Mm* ISCU.

We first examined the C104S ISCU mutant. As observed with WT ISCU, a significant proportion of the C104S ISCU mutant was eluted as aggregates by SEC, but the monomer was still the major form (**Fig. 5a, orange curve**). Then to assess the affinity of iron for S₁ and S₂ previously characterized by Mössbauer spectroscopy (**Table 3**), monomeric apo-ISCUC^{104S} was incubated with a sub-stoichiometric amount of iron. The Mössbauer spectrum of apo-C104S incubated with 0.5 equivalent showed the presence of a single species, characterized by a doublet with parameters identical to those previously reported for S₁ in C104S incubated with 1 equivalent of iron that was attributed to iron in the assembly site (**Fig. 5b, Table 3**). This indicates that iron has higher affinity for the assembly site than for the iron-binding site of S₂. Indeed, the linewidth of S₂ was much larger than S₁, 0.65 mm.s⁻¹ versus 0.35 mm.s⁻¹, respectively (**Table 3**), which strongly suggested that S₂ corresponds to non-specifically bound or free iron. Both, the isomer shift and the quadrupole splitting, of WT ISCU and S₁ in the C104S mutant were identical within the experimental error, which points to an overall conservation of the ligands, the geometry and the bond distances of the Fe^{II} center in the C104S mutant. To strengthen these data, we analyzed the C104S mutant by EPR spectroscopy.

Depending on their zero-field splitting (ZFS) parameters, high spin ferrous iron species ($S = 2$) exhibit EPR spectra at X-band (~ 9 GHz).⁵⁸ EPR spectra of integer-spins can be observed with the microwave magnetic field B_1 either perpendicular or parallel to the applied static magnetic field B_0 but are normally best detected using the parallel mode.⁵⁹ The X-band parallel mode EPR spectrum of WT Fe^{II}-ISCU is shown on **Fig. 5c** and displayed a derivate peak at $g \sim 14.9$ corresponding to a transition within the non-Kramers doublet “ $M_S = \pm 2$ ” of the $S = 2$ Fe^{II} center. To our knowledge, it is the first EPR signal ever reported for a Fe²⁺-bound ISCU species. This signature was observed in various Fe^{II}-ISCU samples (ISCU proteins incubated with 0.5 - 0.8 eq. of ferrous iron), was not present in a control sample with 0.5 mM Fe^{II} in buffer and was identical for *Mm* and *Ec* ISCU proteins incubated with iron (**supplementary Fig. S4a**). Furthermore, the intensity of the EPR spectrum of WT *Mm* ISCU was decreased by about 3-fold in phosphate compared to Tris buffer, which confirms the CD data indicating that the buffer influences the stability of iron within ISCU (**supplementary Fig. S4b**). The EPR signature was slightly shifted at higher field ($g \sim 13.4$) in the C104S mutant (**Fig. 5c**), showing that the electronic structure of the Fe^{II} center is sensitive to the mutation, which suggests that Cys104 is part of the second shell of residues surrounding the Fe^{II} center.

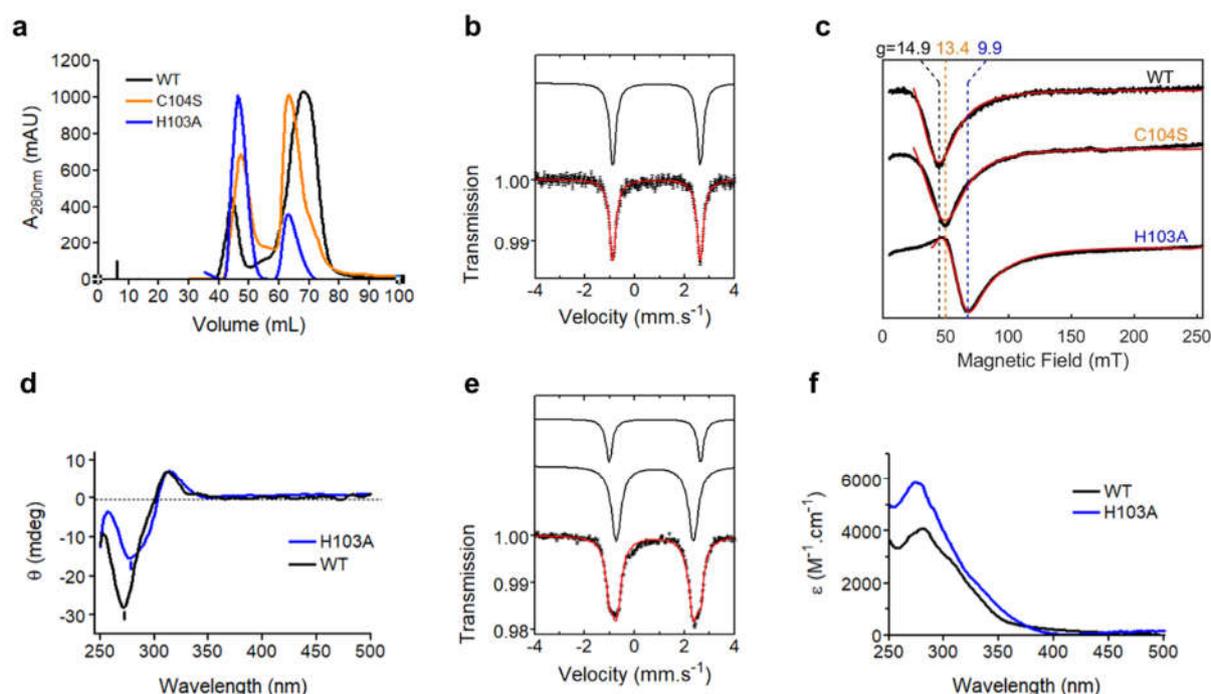


Figure 5: Characterization of the C104S and H103A mutants of *Mm* ISCU

(a) SEC analysis of WT, C104S and H103A after removal of the zinc ion. (b) Mössbauer spectrum of C104S incubated with 0.5 eq. of ferrous ion. (c) Parallel-mode X-band EPR spectra of WT (0.7 mM), C104S (1 mM) and H103A (0.7 mM) ISCU proteins incubated with ferrous iron (0.5 mM) in Tris buffer. EPR recording parameters: temperature, 7 K; microwave frequency, 9.38 GHz; microwave power, 1 mW; modulation amplitude, 2 mT. EPR simulations (red lines) were performed assuming an isotropic $g = 2$ value with standard deviation parameter of the Gaussian distribution, $\sigma_{E/D}$, of 0.004 (WT), 0.008 (C104S) and 0.016 (H103A). (d) CD spectra of WT and H103A incubated with 1 eq. of iron. (e) Mössbauer spectrum of H103A incubated with 0.5 eq. of iron. Mössbauer parameters: temperature, 77 K; the solid lines are simulations with parameters given in Table 3; red line, best fit of the experimental data; black lines, components of the simulation. (f) Electronic absorption spectra of WT ISCU (100 μ M) incubated with 1 equivalent of iron (100 μ M) and H103A mutant (200 μ M) incubated with 0.5 equivalent of iron (100 μ M). The absorption of the apo-proteins was subtracted.

Table 3. Mössbauer parameters of WT, C104S and H103A *mM* ISCU

^a Molar equivalent of ferrous iron added to ISCU. ^b Only parameters for simulation with Set 1 are displayed, parameters for Set 2 are presented in Supplementary Table 1.

<i>mM</i> ISCU	Eq. Fe ^a	species	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Γ (mm/s)	% Area	References
WT	0.7	-	0.88 (1)	3.51 (1)	0.35 (1)	100	¹⁵
C104S	1	S ₁	0.87 (1)	3.51 (1)	0.35 (1)	63	¹⁵
		S ₂	1.23 (1)	3.15 (1)	0.65 (1)	37	
C104S	0.5	-	0.87 (1)	3.51 (1)	0.35 (1)	100	this work
H103A ^b	0.5	S ₁	0.81 (1)	3.08 (1)	0.47 (1)	73 (2)	this work
		S ₂	0.81 (1)	3.65 (1)	0.30 (1)	27 (2)	

To assess the effect of the C104S mutation in more details, we analyzed the zero-field splitting (ZFS) parameters, E and D , of the Fe^{II} center in WT ISCU and the C104S mutant. We first investigated the temperature dependence of the $g \sim 14$ signal, which provides access to the sign and an estimation of the value of D . The product of signal intensity by the temperature is proportional to the Boltzmann population distribution of each sublevel which itself relies on the ZFS parameters (see **Methods**). The data were analyzed by measuring the base-to-trough amplitude of the signal for each temperature, under non-saturating conditions, and the product of the signal intensity by the temperature was plotted as a function of the temperature (**supplementary Fig. S5**). For temperature above 13 K, the line width of the signal was broadened by relaxation enhancement and thus the amplitude was no longer proportional to the signal intensity. The results for temperature below 13 K showed that the population of the non-Kramers doublet decreases as the temperature increases, which indicates that the “ $M_S = \pm 2$ ” doublet is the ground state of the $S = 2$ manifold and thus that the axial ZFS parameter (D) is negative. The data were then adjusted according to the Boltzmann equation in which the energy states of the $S = 2$ manifold derived from the spin Hamiltonian. Typically, the temperature-dependent Boltzmann distribution associated to a “ $M_S = \pm 2$ ” sub-level depends mostly on the D term. In a first step, fittings were thus performed assuming an axial zero field splitting ($E = 0$). The best fits gave D parameter of $-6.5 \pm 1.0 \text{ cm}^{-1}$ and $-4.0 \pm 1.0 \text{ cm}^{-1}$ for the Fe^{II} center in WT ISCU and C104S mutant, respectively (**supplementary Fig. S5, Table 4**). In a second step, we performed numerical simulations of the $g \sim 14$ signal (**Fig. 5c**). All simulations were performed by assuming an isotropic $g = 2$ tensor and by introducing some distribution of the ZFS parameters (D , E and/or E/D) to reproduce the line shape as described for other integer spin systems.⁵⁹⁻⁶¹ Moreover, in the case of $S = 2$ spin systems, only a fraction of this distribution satisfies the resonance condition at X-band (microwave energy $\sim 0.3 \text{ cm}^{-1}$) and contributes to the EPR spectrum,^{59,62} thus simulations were made using a Gaussian distribution of either the axial term, D , or of the rhombicity parameter, E/D . The best fits were achieved using a Gaussian distribution of the E/D parameter and yielded D and E/D values of

$\sim -5.9 \text{ cm}^{-1}$ and 0.13 for the WT and $\sim -3.5 \text{ cm}^{-1}$ and 0.17 for C104S (see legend of **Fig. 5c** and **Table 4** for all simulation parameters). These values were in good agreement with the D values estimated from the Boltzmann population distribution.

Overall, the Mössbauer parameters (δ , ΔE_Q) indicate that the geometry and the ligands of the Fe^{II} center are unchanged between WT and C104S, while the EPR data, that are more sensitive to ZFS parameters, pointed out some variations. The ZFS parameters were shown to be sensitive to small geometrical distortions of the metal center but also to the changes of Lewis basicity of the ligands by remote ligands substituents.⁶³⁻⁶⁵ As the quadrupole splitting is mainly sensitive to variations of the first coordination sphere of the metal, we conclude that the modifications of the ZFS parameters reflect changes from the secondary coordination sphere of the Fe^{II} center in ISCU. In conclusion, Mössbauer and EPR data support the idea that Cys104 is not a ligand but is part of the second shell of residues around the Fe^{II} center, which stabilize the iron in the assembly site.

Table 4. Zero Field Splitting parameters of the $S = 2$ spin state determined by EPR in WT, C104S and H103A mM Fe-ISCU

^a ZFS parameters estimated by two different ways: **Temp.**, from temperature dependence of the low-field EPR signal with Boltzmann population distribution of the “ $M_s \pm 2$ ” sub-level reported in Fig. S5. The rhombic ZFS parameter, E , could not be determined accurately from the temperature study and therefore fittings were made assuming $E = 0$. **Simul.**, from spectral simulations reported in Fig. 4c.

<i>mM</i> ISCU	Method ^a	D (cm ⁻¹)	E/D	E (cm ⁻¹)
WT	Temp.	- 6.5 (9)	0	0
	Simul.	- 5.9	0.13	0.76
C104S	Temp.	- 4.0 (9)	0	0
	Simul.	- 3.6	0.17	0.6
H103A	Temp.	- 2.5 (9)	0	0
	Simul.	- 0.9	0.31	0.29

We next investigated iron binding to the H103A mutant. A retrospective analysis revealed that the cysteine residues were oxidized as disulfide bonds in the samples of the H103A mutant previously analyzed by Mössbauer, which precluded iron insertion in the assembly site (**supplementary Fig. S6**, lane 2). The SEC analysis furthermore indicated a more pronounced susceptibility of the H103A mutant to aggregate, than the WT and C104S mutant (**Fig. 5a**). To assess iron binding to H103A, we prepared samples of the H103A mutant under reducing conditions using DTT to keep the cysteines in their reduced states (see **Methods**). Under these conditions, the cysteines of the H103A mutant were fully reduced (**supplementary Fig. S6**, lane 3). The CD spectra of reduced monomeric H103A incubated with one equivalent of iron displayed typical CD absorptions attributed to $\text{Cys} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ LMCT but at slightly lower energies and with reduced intensity for the negative features, compared to WT ISCU (**Fig. 5d**). To assess the possibility that H103A had lower affinity for iron, we incubated

H103A with higher amount of iron (2 equivalents), but the intensity did not increase (**Supplementary Fig. S7**, ratio 1:2). In contrast, the intensity of the CD signal was increased by approximately 45 % when the concentration of H103A was doubled, keeping iron constant (**Supplementary Fig. S7**, ratio 2:1). This indicates that about 30% of the H103A ISCU protein could not bind iron in the assembly site with a 1:1 ratio. This might be due to the formation of aggregates during concentration of the monomeric form. Moreover, two distinct peaks were now visible at the 2:1 ratio, at 271 nm and 281 nm, which pointed to the presence of different species depending on protein:iron ratio.

An EPR signal was still visible in the X-band parallel-mode spectrum of the H103A ISCU mutant but was largely shifted to higher magnetic field, with a resonance line at $g \approx 9.9$ (**Fig. 5c**). From the temperature dependence study of the $g \sim 9.9$ signal, we determined an axial parameter, D , of -2.5 cm^{-1} , a value that may be partly overestimated because the plateau (corresponding to 100% population of the ground state “ $M_S \pm 2$ ” sub-level) could not be reached at the lowest temperature of our experiments (**supplementary Fig. S5**). The best simulation of the $g \sim 9.9$ signal gave parameters of $D = -0.95 \text{ cm}^{-1}$ and $E/D = 0.31$, thus reflecting large changes in the electronic structure of the Fe^{II} ion in the H103A mutant. The Mössbauer spectrum of H103A prepared with 0.5 equivalents of iron shows the contribution from two species coordinated by cysteine residues (**Fig. 5e**). Two different set of parameters (Set 1 and 2) could fit the experimental data (**Supplementary Table 1, Supplementary Text 1**). Set 2 was discarded due to unrealistic isomeric shift indicative of a coordination of the Fe^{II} center by four sulfurs whereas the assembly site of ISCU contains only three cysteines. Set 1 yielded two species with identical isomeric shift but different quadrupole splitting, which pointed to species with the same coordination sphere but with slightly different geometries (**Table 3**, S_1 and S_2). We note that only one signature was detected by EPR, likely because S_1 and S_2 display electronic parameters too close to be resolved at X-band (9 GHz), as shown before for $\text{Fe}[(\text{SPPH}_2)_2\text{N}]_2$ complex that exhibit two main conformers only distinguishable at high frequencies EPR.⁶⁶

The isomeric shift of S_1 and S_2 ($\delta = 0.81 \text{ mm.s}^{-1}$) was lower than the value determined for WT ISCU ($\delta = 0.88 \text{ mm.s}^{-1}$), which suggested that the number of sulfurs was increased from 2 to 3 thus that His103 was replaced by Cys104 since it is the only available cysteine and moreover at close distance of the Fe^{II} center. However, a coordination by two cysteines could not be totally excluded based on the value of the isomeric shift.¹⁵ A coordination by two cysteines would be possible if Asp37 switches to the bidentate mode to fill the empty position left by His103. However, the quadrupole splitting was shown to decrease by 1 to 2 mm.s^{-1} upon switch to the bidentate coordination mode in a series of structurally similar Fe^{II} models complexes,⁶⁷ but the quadrupole splitting of S_1 was only decreased by 0.46 mm.s^{-1} and the value of S_2 was increased. Thus, these changes are not consistent with a switch to the bidentate mode. In contrast, the replacement of His103 by Cys104 could account for small changes in the quadrupole splitting values. To further assess the hypothesis that Cys104

replaces His103, we analyzed the intensities of the LMCT bands that are correlated with the number of cysteines. The intensity of the UV-visible spectra in the LMCT region (200 - 400 nm) was increased in the H103A ISCU mutant compared to the WT protein, which suggested the presence of a higher number of cysteines (**Fig. 5f**). Values in the range of 1800 to 2400 M⁻¹.cm⁻¹ were reported for the Fe^{II} center of azurin that is structurally similar to Fe-ISCU but with a coordination sphere including a single cysteine residue.⁶⁸ The value of the absorption coefficients for the most intense peak in Fe-ISCU WT (280 nm) was 4050 M⁻¹.cm⁻¹, which fits well with the presence of two cysteines by using an empiric value of ~ 2000 M⁻¹.cm⁻¹ per cysteine residue (**Fig. 5f**). The absorption coefficients for the most intense peak in the H103A mutant (275 nm) was 5900 M⁻¹.cm⁻¹, which is consistent with a coordination by three cysteine residues and thus supports the hypothesis that in the absence of His103, Cys104 becomes a ligand. The presence of two species with distinct quadrupole splitting values might be explained by different conformations of the Fe^{II}(Cys)₃(Asp) center and could be related to the two similar species detected by CD (**Supplementary Fig. S7**). Altogether, these data indicate that H103 is the fourth ligand of the Fe^{II} center in *Mm* Fe-ISCU and that Cys104 can replace it.

Conclusion

Collectively our studies of the ISCU proteins from *E. coli*, *C. thermophilum*, *M. musculus* and *H. sapiens* provide evidence that the insertion of iron in the assembly site of ISCU is a conserved process across species. This contrasts with the data reported by the Stemmler group on *T. maritima*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* and *H. sapiens* ISCU proteins indicating that iron initially binds at an auxiliary site. These studies were performed at pH 7.0 and under conditions that might have favored the oligomerization of ISCU. We show here that iron binding to the assembly site is more efficient at pH 8.0 with the monomeric form of ISCU and totally abolished at pH 7.0 with the oligomerized form. We thus infer that the pH conditions and the accumulation of aggregated ISCU impaired the insertion of iron in the assembly site of ISCU in previous studies. Since iron binding to the assembly site was shown to stabilize the structured state of ISCU, the pH dependence might be related to the equilibrium between the structured and destructured states.¹⁵ The pH study further showed that as the amount of iron in the assembly site is raised with the pH, the efficiency for Fe-S cluster assembly with the complete ISC machinery also increases, for both prokaryotic and eukaryotic ISCU proteins. These data thus indicate that the insertion of iron in the assembly of ISCU is correlated with Fe-S cluster assembly. Hence, that it is the initial step of Fe-S cluster synthesis and is a conserved process across species, which rules out that the non-cysteinyll site has a role in this process. Moreover, pH 8.0, at which both, iron insertion in the assembly site and enzymatic activity for Fe-S cluster assembly, are more efficient, is close to the physiological of the eukaryotic *Ct*, *Mm* and *Hs* ISC machineries that are located in mitochondria where the pH is around 8.0. This strengthens the idea that binding of iron to the assembly site is physiologically relevant. The situation is more complex for bacteria, since their internal pH relies on external conditions and thus depends on their habitat.³⁹⁻⁴² *E. coli* strains colonize different parts of the gastrointestinal tract, essentially the small intestine where the pH is acidic, in the range of 6.0 - 7.0, and the colon where it is ranging from 7.0 - 8.5.⁴¹ Thus, the pH dependence of the Fe-S cluster assembly reaction in *E. coli* could be related to adaptation to different physiological conditions and the ability to colonize different parts of the intestinal tract.

We next structurally characterized the iron center of mouse ISCU at pH 8.0 by CD, NMR, XAS, Mössbauer and EPR spectroscopies. The results of these studies are consistent with each other and indicate that the Fe^{II} center is coordinated by four strictly conserved aas of the assembly site: Cys35, Asp37, Cys61 and His103, which further strengthens the hypothesis that iron binding to the assembly site is a conserved process. The EPR analysis also points out that Cys104, the fifth conserved aa of the assembly site that is the persulfide acceptor in ISCU, is very close to the iron center. Strikingly, the same structural organization has been reported when zinc was bound to the assembly of ISCU instead of iron, with Cys35, Asp37, Cys61 and His103 ligating the metal center and Cys104 at close distance.¹⁷ Since zinc can functionally replace iron for persulfide transfer to Cys104 and for the stimulation of this process by FXN,¹⁵ this structural organization might be critical to enable

FXN-stimulated metal-dependent persulfide transfer. The CD and Mössbauer studies further indicate that Cys104 might replace His103 in the H103A mutant by filling the empty position on the iron center. This structural rearrangement is reminiscent of the effect of FXN on the zinc center of the human NFS1-ISD11-ACP-Zn-ISCU complex that pushes His103 aside and allows Cys104 to replace it.¹⁴ Thereby, the motion of Cys104 toward the iron center, through swapping with His103, could be a key structural feature to enable persulfide transfer and its acceleration by FXN. These data thus pave the way to elucidate the mechanism of Fe-S cluster assembly through step-by-step studies of the structural rearrangements of the iron center enabling persulfide transfer, its reduction and the formation of the [2Fe2S] cluster.

Methods

Chemicals

Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium chloride (NaCl), sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol (DTT), L-cysteine, protease inhibitor cocktail (sigmafast), His₆-thrombin, diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), ferrous ammonium sulfate ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$), imidazole, zinc sulfate (ZnSO_4), β -mercaptoethanol, acrylamide:bis-acrylamide (29:1), Mal-d-PEG, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pyridoxal phosphate (PLP), ferric ammonium citrate (FAC), riboflavin 5'-monophosphate sodium (riboflavin), ammonium sulfate (NH_4SO_4), low molecular weight size exclusion calibration kit were from Sigma–Aldrich. HisBind Resin from Novagen, Q-sepharose and Phenyl Sepharose from GE Healthcare, Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units from Millipore, PD10 column from Amersham Biosciences.

Protein purification

ISCU. *Mm* and *Hs* ISCU protein were prepared following previously described procedures.¹⁵ Expression of *Ec* IscU with a polyhistidine tag at the N-terminus was performed using *E. coli* strain C41(DE3) carrying pVP67K plasmid encoding IscU-His8.⁶⁹ Expression of *Ec* IscU was induced by addition of 1 mM IPTG at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$. After 3 h, cells were harvested and lysed in a French Press in buffer A (25 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10% glycerol, pH 8.0) supplemented with 1 mM PMSF) containing 20 mM imidazole. Cell debris were removed by centrifugation at 75 000 g for 60 min at 4°C. The supernatant was loaded on a HisBind column beforehand washed with buffer A supplemented with 1 M KCl and equilibrated in buffer A. The proteins were eluted over a linear imidazole gradient from 20 to 500 mM in buffer A. The fractions containing *Ec* IscU were pooled and concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units with a cutoff of 10 kDa prior treatment with 100 mM KCN for 1h at 25°C to remove polysulfane modification.⁷⁰ KCN was subsequently removed by gel filtration in buffer B (20 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 10 % glycerol, pH 8.0) using a PD10 column. Final preparations of IscU were aliquoted and stored at - 70°C. Expression of *Ct* Isu1 with a polyhistidine tag at the C-terminus was induced in the *E. coli* strain C41(DE3) carrying pET21d ISU1Ct-His6 plasmid by adding IPTG at a final concentration of 1 mM at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$. Cells were harvested, suspended in buffer C1 (25 mM Tris–HCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 0.5 M KCl, 0.05 % Triton X- 100, 50 mM imidazole, pH 8.0), and lysed using a French press. Cell debris were removed by centrifugation at 75 000 g for 60 min at 4°C. The supernatant was loaded on HisBind column beforehand washed with buffers C2 (25 mM Tris–HCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 1 M KCl, 0.05 % Triton X-100, 50 mM imidazole, pH 8.0) and equilibrated in buffer C3 (25 mM Tris–HCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 150 mM KCl, 0.05 % Triton X-100, 50 mM imidazole, pH 8.0). The proteins were eluted over a linear imidazole gradient from 50 to 500 mM in buffer C1. The fractions containing *Ct* Isu1 were pooled and

concentrated. Next *Ct* Isu1 was incubated with 100mM KCN for 1h at 25°C to remove polysulfane modifications. KCN was subsequently removed by gel filtration in buffer B using a PD10 column. Aliquots were shock frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use.

Apo-IscU, Fe-IscU. The ISCU proteins (WT and mutants) were incubated with 50 molar equivalents of DTT and 100 molar equivalents of DTPA for 1 hour to remove zinc and keep the cysteines in their reduced states, then loaded on a HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade column pre-equilibrated with buffer T1 (20 mM Tris, 250 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 8.0). The fractions containing the monomeric apo form and the oligomeric forms were concentrated to 1-3 mM by centrifugation on Amicon filter membrane 10 kDa and transferred inside the glove box. The samples were desalted and deoxygenated by gel filtration on a NAP5 column in deoxygenated buffer T2 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0). The samples were further deoxygenated by incubation for 2 h at 10°C in opened cap tubes, then aliquoted and stored with glycerol (10% final concentration) at -80 °C.

For experiments performed in other buffers, the apo-ISCU proteins in T2 buffer were buffer exchanged with buffer P (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0), H7 (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.0) or H8 (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8.0) by gel filtration on a NAP5 column. For experiments performed at various pH in Tris buffer, apo-ISCU proteins in T2 buffer were incubated with different ratios of buffer T2 and buffer T3 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 6.5).

NFS1, IscS. *Mm* and *Hs* NFS1-ISD11-ACP complex containing *Ec* ACP were prepared following previously described procedures.¹⁵ For *Ec* IscS protein, C41(DE3) competent cells (Novagen) transformed by the IscS expression plasmid, pET11aIscS,⁷¹ were used to inoculate 400 mL of LB medium containing 100 µg/mL ampicillin. The cells were grown overnight at 37 °C. The inoculum was diluted to OD_{600nm} = 0.1 in 6 L of LB medium containing 100 µg/mL ampicillin. The expression of IscS was induced at OD_{600nm} = 0.6 with 1 mM IPTG. Then the cells were supplemented with 50 µM PLP and 3% ethanol and grown at 20°C overnight.⁷² Cells were harvested by centrifugation, then freeze/thawed, and lysed by French press in D1 buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) containing 0.4 mM PMSF. Cell debris were removed by centrifugation at 75 000 g for 60 min at 4°C. The supernatant was loaded on a Q-sepharose equilibrated in buffer D1 and then the column was washed with buffer D1 containing 0.4 mM PMSF. The protein was eluted using a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in buffer D1. The fractions containing IscS were pooled and concentrated using Amicon Ultra-15 then dialyzed against buffer E (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8.0). The protein sample was supplemented with 1 M NH₄SO₄ and applied to a Phenyl Sepharose column. IscS was eluted with a linear gradient from 1 M to zero NH₄SO₄. Yellow fractions containing IscS were concentrated by ultrafiltration and further treated with 100µM PLP. Purified IscS was dialyzed to buffer B and stored in -70 °C until used.

FDX2, Fdx. *Hs* FDX2 was purified as previously described.¹⁵ For *Ec* Fdx, BL21(DE3) cells transformed with pDEST24Fdx⁷³ were grown in LB at 37°C and the expression of Fdx was induced with 1 mM IPTG

at $OD_{600nm} = 0.6$ and supplemented with 50 μ M FAC during overnight induction period. Cells were harvested by centrifugation, frozen, thawed, and lysed by French press in F1 buffer (50 mM Tris-HCl, 10 % glycerol, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Cell debris were removed by centrifugation at 75 000 g for 60 min at 4°C. The supernatant was loaded on a Q-sepharose column equilibrated in buffer F1 and then the column was washed with buffer F1 containing 1 mM PMSF. Fdx was eluted using a linear gradient of NaCl from 100 mM to 500 mM NaCl in buffer F1. The fractions containing Fdx were pooled and concentrated using Amicon Ultra-15 and then dialyzed against F1 buffer. The samples were then supplemented with 2 M NH_4SO_4 and loaded on a Phenyl Sepharose column. Fdx was eluted with a linear gradient from 2 M to zero NH_4SO_4 . Fractions containing Fdx were concentrated by ultrafiltration and dialyzed against buffer F2 (50 mM Tris-HCl, 10 % glycerol, 50 mM NaCl, pH 7.5). The final preparation of Fdx was aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C.

FDXR, FdxR. Expression of human FDXR with a polyhistidine tag was performed in the *E. coli* strain BL21(DE3). Cells were transformed by the FDXR expression plasmid, pETDuet1FDXR and pOFXGroEL plasmid carrying bacterial GroEL to increase the solubility of overproduced FDXR. *E. coli* cells transformed with both plasmids were used to inoculate 400 ml of LB medium containing 100ug/ml ampicillin and 34ug/ml chloramphenicol. The cells were grown overnight at 37 °C. The inoculum was diluted to $OD_{600nm} = 0.1$ in 6 L of LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin and 34 μ g/mL chloramphenicol. Cells were subsequently grown to $OD_{600nm} = 0.6$ to induce expression of FDXR by adding IPTG to final concentration of 1 mM. The culture was supplemented with 3.75 μ M riboflavin and grown overnight at 25°C. The cells were harvested, suspended in buffer G1 (25mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1mM PMSF, 150 mM NaCl, pH 8.0) and lysed using a French press. Cell debris were removed by centrifugation at 75 000 g for 60 min at 4°C. The supernatant was loaded on a HisBind column beforehand washed with buffers G2 (25mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1mM PMSF, 500 mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8.0) and G3 (25mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1mM PMSF, 150mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8.0) and equilibrated in buffer G3. The proteins were eluted with a linear gradient imidazole from 10 to 250mM in buffer G1. The fractions containing FDXR were pooled and dialyzed against buffer I1 (25mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10% glycerol, pH 8.0). The protein sample was loaded to a Q Sepharose column and FDXR was eluted with a linear gradient of NaCl from 50 to 500 mM in buffer I1. Yellow fractions containing FDXR were concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra-15 dialyzed against buffer I1. The preparation of FDXR was aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. *Ec* flavodoxin reductase (FdxR) was purified as described with some modifications.⁷⁴ HMS174 (DE3) cells containing pET11a-FdxR with N-terminal 6xHis tag were grown overnight in LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin. 400 mL of the overnight culture were used to inoculate 6 liters of LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin and the cells were grown at 30 °C. The expression of *Ec* FdxR was induced with 1 mM IPTG at $OD_{600nm} = 0.6$ and riboflavin was added to a final concentration of 3.75 μ M, followed by 4 h of growth/induction. Cells overexpressing FdxR were

pelleted, suspended in ice-cold buffer G3 and lysed by French press. The lysed cells were centrifuged at 75000 g for 60 min. The supernatant was applied to HisBind column equilibrated with buffer G1. The proteins were eluted with a linear gradient of imidazole from 10 to 250 mM in buffer G1. Fractions containing FdxR were pooled and concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra-15 and subjected to buffer exchange to buffer B using a PD10 column. Pure FdxR was aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C.

Concentration determination

Protein concentrations were determined by UV-visible at 278 nm in urea 8M, Tris 0.1 M, pH 7.5 using absorption coefficients determined according to Uniprot website (ProtParam software).

Redox state of the cysteine residues

The redox state of the cysteine residues in H103A ISCU was probed using a heavy alkylating agent (Mal-dPEG, MW = 2.3 kDa) to generate protein adducts with molecular weights proportional to the number of reduced cysteines that are detected by band shift on SDS-PAGE. A volume of 50 µL of the ISCU H103A protein at a concentration of 20 µM was incubated with 2.3 µL of a solution of Mal-dPEG (3.6 mM in H₂O with 3 % SDS) for 30 min at 20°C. 5 µL of Laemli buffer was added to 9.5 µL of the reaction mixture and incubated for 30 min at 20°C. A volume containing 200 pmoles of ISCU was loaded on 14 % acrylamide gels. The gel was run for 2 hours at 90 V and the proteins were revealed by coomassie staining. The gels were imaged using an Odyssey scanner (Li-COR).

Fe-S cluster assembly assays

Fe-S cluster assembly assays for *Ec*, *Ct*, *Mm* and *Hs* ISCU proteins were performed using a previously described procedure.¹⁵ All the proteins (NFS1, IscS, FDX2, FDXR, Fdx, FdxR, FXN) were buffer exchanged in the glove box on a NAP-5 column with buffer T2 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0) then deoxygenated overnight at 10°C and aliquoted with 10 % glycerol, except apo-ISCU proteins that were already prepared and stored under these conditions. The apo *Ec*, *Ct*, *Mm*, *Hs* ISCU proteins (100 µM) were incubated with one molar equivalent of ferrous iron. Then, *Ec* Fe-IscU (100 µM) was incubated with 5 µM of *Ec* IscS, *Ec* Fdx and *Ec* FdxR, *Mm* and *Ct* Fe-IscU (100 µM) were incubated with 5 µM of *Mm* NFS1-ISD11-ACP, *Mm* FDX2, *Hs* FDXR and *Mm* FXN and *Hs* Fe-IscU (100 µM) was incubated with 5 µM of *Hs* NFS1-ISD11-ACP, *Hs* FDX2, *Hs* FDXR and *Hs* FXN. All reactions contained 100 µM of NADPH and 100 µM of L-cysteine and were completed to a final volume of 100 µL with buffer T2. The kinetics of Fe-S cluster assembly were initiated by adding L-cysteine and were monitored at 456 nm by electronic absorption spectroscopy.

For pH studies, the reactions were completed to 100 µL with different ratios of buffer T2 and T3 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 6.5). T2:T3 volume ratios of 35:35 µL, 10:60 µL and 0:70 µL were used to reach final pH of 7.7, 7.4 and 7.2.

Electronic and CD spectroscopies

Electronic absorption spectra in the UV-visible domain were acquired using a Secomam UVIKON XL spectrometer and CD spectra using a Jasco J-815 CD spectrometer. For experiments performed in other buffers, the apo-ISCU proteins in T2 buffer were buffer exchanged in buffer P (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0), H7 (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.0) or H8 (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8.0) by gel filtration on a NAP5 column. Then the proteins (5 μ L, 2 mM) were mixed with 5 μ L of ferrous ammonium sulfate (2 mM) prepared in water and the solution were completed to 100 μ L with the corresponding buffer.

For experiments performed in Tris buffer at various pH, 5 μ L of apo-ISCU proteins (2 mM) in T2 buffer were incubated with different ratios of buffer T2 and buffer T3 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 6.5). T2:T3 volume ratios of 45:45 μ L, 15:75 μ L and 8:82 μ L were used to reach final pH of 7.7, 7.4 and 7.2. Then the protein samples were mixed with 5 μ L of ferrous ammonium sulfate (2 mM) prepared in water.

NMR spectroscopy

$^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ labelled ISCU was produced in minimum medium complemented with 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^{13}C -glucose and 20 μM ZnCl_2 . NMR samples were prepared in 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl buffer. 7.5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ was added to lock the spectrometer frequency. For Fe-ISCU a valved 3 mm NMR tube was prepared and closed inside the globe box. ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC spectra (0.2 ms recycling delay, 64 and 256 scans for Zn-ISCU and Fe-ISCU, respectively) were acquired at a temperature of 293 K on a Bruker NMR spectrometer operating at a magnetic field of 18.8 T and equipped with a cryoprobe. Triple resonance experiments for backbone assignment (HNCACB, HBHA(CO)NH and BEST-TROSY versions of HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CO)CACB) were carried out for 300 μM Zn-ISCU at 14.1 T at 298K in a buffer supplemented with 1 mM DTT. ^1H chemical shifts were referenced to DSS. NMR data analysis was performed in CCPNMR 2.4 software.⁷⁵

XAS spectroscopy

The Fe-ISCU samples were prepared by incubating monomeric *Mm* apo-ISCU (3 mM) with 0.7 equivalent of ferrous ammonium sulfate salt in Tris buffer containing 20 % of glycerol (final concentration). The samples were transferred to homemade sample holders and sealed with Kapton tape before freezing in liquid nitrogen. XAS data of model compounds (1), (2), (3) and (4) were kindly provided by Serena DeBeer. Synthesis and structural characterizations of compounds (5), (6) and (7) were previously reported.^{52,53,55} Crystals of compounds (5), (6) and (7) were crushed into fine powder under anaerobic conditions in a glove box and compacted into pellets using a manual hydraulic press. The samples were mounted on a cannula and inserted into the cryostat. Bulk XAFS analysis of Fe-ISCU and compounds (5), (6) and (7) was conducted at SAMBA beamline, Synchrotron SOLEIL, France. The electron storage ring was operated at 2.75 GeV with a 500 mA beam current. A Si(220) double crystal monochromator was employed, which was calibrated by assigning the first inflection of a Fe foil

XANES spectrum to 7112 eV. The XAFS spectra were collected in fluorescence mode using a Ge 33-pixel detector and XIA DxMap DSP cards, XIA cards dead time correction was applied. The sample was cooled to 20K using a He cryostat to reduce thermal disorder and prevent beam damage. Spectra were collected from 7000 to 8000 eV using a continuous scan acquisition mode, with a 1.25 eV/s velocity and 0.16 s/point integration time. Therefore, each scan was obtained in 800 seconds and featured 5000 data points with a 0.2 eV step size. A hundred scans for the protein sample were collected and averaged together to get good S/N ratios. All XAFS data processing (baseline correction, subtraction, normalization, peak integration) were done using Athena and Artemis in Demeter/IFEFFIT software package and the Origin software for peak deconvolution and integration.⁷⁶ The pre-edge peaks of the XANES spectra were deconvoluted using the pseudo-Voigt function with 50:50 ratio of Lorentzian and Gaussian functions. A consecutive optimization of amplitudes, band positions and of the half-width of the individual bands was performed in order to obtain the most acceptable fits. The absolute error due to the deconvolution variability and the baseline correction was estimated to be $\pm 3.5\%$. No smoothing procedures were applied. EXAFS data were converted to k space using an E_0 value of 7122 eV. The EXAFS data of Fe-ISCU were fitted over a k range of 3 to 12.0 \AA^{-1} using a constant amplitude reduction factor, $S_0^2 = 0.95$. The spectra were fitted using the following parameters: N , the number of coordinating atoms, σ^2 , the Debye–Waller factor and R , the distance between the absorber (Fe) and the backscattering atoms. The crystallographic data of the model compound (**3**) (open crystallography database, ID 4302291)⁷⁷ were used in IFEFFIT to provide initial values for atomic scattering amplitudes and phase shifts in EXAFS fits. A first fit was performed with all parameters free (Fit #1) and then several other fits with pre-set number and nature of coordinating atoms (Fit #2 to #9) to evaluate the robustness of the first fit. The goodness of fit was evaluated based on the values of σ^2 ($\sigma^2 < 6.10^{-3} \text{\AA}^2$) and of the R -factor with values < 0.02 denoting that the fit is good enough.⁷⁸

Mössbauer spectroscopy

The C104S and H103A Fe-ISCU mutant samples were prepared by incubating monomeric *Mm* apo-ISCU C104S and H103A (1-2 mM) with 0.5 molar equivalent of ^{57}Fe ammonium sulfate salt to a final volume of 350 μL in Tris buffer containing 10% glycerol. The samples were transferred into homemade sample holders and frozen inside the glove box. Mössbauer spectra were recorded in the constant acceleration mode with a conventional spectrometer from Wissel GmbH with a multi-channel analyzer in the time-scale mode (WissEL GmbH). A LN_2 bath cryostat (Oxford industries) was used to conduct experiments at 77 K. Isomer shifts δ are given relative to α -iron at room temperature. After transfer of the data from the multi-channel analyzer to a PC the public domain software Vinda⁷⁹ running on an Excel 2003 platform was used to analyze the data. Spectra were analyzed by least-squared fits using Lorentzian line shapes.

EPR spectroscopy

The EPR samples were prepared by mixing monomeric *Mm* apo-ISCU WT, C104S and H103A (0.7 – 1 mM) with 0.5 - 0.7 molar equivalents of ferrous ammonium sulfate in either Tris or phosphate buffers containing 10% of glycerol to a final volume of 180 μ L. The samples were transferred into calibrated quartz EPR tubes and then sealed with a septum before freezing in liquid nitrogen. EPR spectroscopy experiments were performed on a Bruker Elexsys E500 spectrometer fitted with an Oxford Instruments ESR-900 helium-gas flow for cryogenic temperature studies and mounted with a Bruker dual mode resonator (ER 4116DM). The magnetic properties of the high spin Fe^{II} center of Fe-ISCU were analyzed using the spin Hamiltonian formalism, as described first for $S = 2$ spin system by Abragam and Bleaney and then developed by others.^{61,80} Briefly, the Spin Hamiltonian (H_S) is written as:

$$H_S = D \left(S_z^2 - \left(\frac{1}{3} \right) S(S+1) \right) + E(S_x^2 - S_y^2) + \beta \mathbf{B} g \mathbf{S}$$

The first two terms describe the zero-field splitting (ZFS), incorporating the axial (D) and rhombic (E) parameters at zero field, while the last term describes the Zeeman interaction. For the $S = 2$ Fe^{II} spin system considered here, the zero-field energy ($\sim D$) is much larger than the energy of the Zeeman interaction ($h\nu \sim 0.3$ cm⁻¹ at X-band). Thus, in the absence of magnetic field, the non-Kramers doublets “ $M_S = \pm 2$ ”, “ $M_S = \pm 1$ ” and “ $M_S = 0$ ”, which are mixed states of the pure $|M_S\rangle$ states when rhombicity ($E/D \neq 0$) happens, are well separated and their energy simply rely on the ZFS parameters.⁶¹ The Boltzmann distribution of the “ $M_S = \pm 2$ ” sub-level population depends mostly on the D term and was then fitted with the convenient assumption of an axial ($E=0$) zero-field splitting case, for which the energies of the $M_S = \pm 2$, $M_S = \pm 1$ and $M_S = 0$ sub-levels are $+2D$, $-D$ and $-2D$, respectively, thus leading to the equation:

$$N_{\pm 2} = \frac{N}{1 + e^{\frac{3D}{k_B T}} + \frac{1}{2} e^{\frac{4D}{k_B T}}}$$

where $N_{\pm 2}$ and N correspond to the populations of the $M_S = \pm 2$ sub-level and of the $S = 2$ manifold, respectively, k_B is the Boltzmann constant (~ 0.7 cm⁻¹.K). The $N_{\pm 2}$ population is proportional to the intensity (or the amplitude) of the low-field EPR signal associated to the non-Kramers “ $M_S = \pm 2$ ” doublet over the temperature and can therefore be experimentally estimated.

Numerical simulations were achieved using the Easyspin toolbox assuming a $S = 2$ system and an isotropic $g = 2$ tensor.⁸¹ The line shapes were generated with an explicit loop over Gaussian distribution of the Spin Hamiltonian parameters, either D or E/D . Simulations were cut at low magnetic field because divergence happened at resonance fields approaching zero, depending on numerical sampling and on the magnetic field range that was explored.⁵⁹ The Gaussian distribution of the rhombicity parameter E/D

used in the spectral simulations was given as FWHM (Full Width at Half Maximum) which is proportional to the standard deviation, σ , through the relation $\text{FWHM} \sim 2.3548 \times \sigma$.

Acknowledgments

This work was funded by the French national research agency (ANR-17-CE11-0021 Frataxur, awarded to B.D.A.), Fondation pour la Recherche Medicale (FDT202012010541, awarded to S.G.), the Polish National Science Center Grant UMO-2015/19/B/NZ1/00237 (to R.D.) and the N.I.H. (R01GM119374 to D.P.G.). The authors are grateful to the EPR facilities available at the national EPR network RENARD (IR CNRS 3443) and the Aix-Marseille University EPR center.

References

1. Garcia, P. S., Gribaldo, S., Py, B., Barras, F. *Res Microbiol* (2019) 170, 426-434.
2. Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., Barras, F. *Biochimica et Biophysica Acta* (2013) 1827, 455-469.
3. Hu, Y., Ribbe, M. W. *Annu Rev Biochem* (2016) 85, 455-483.
4. Chahal, H. K., Boyd, J. M., Outten, F. W. *Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Archaea and Bacteria*. (2013).
5. Nyvltova, E., Sutak, R., Harant, K., Sedinova, M., Hrdy, I., Paces, J., Vlcek, C., Tachezy, J. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110, 7371-7376.
6. Boyd, E. S., Thomas, K. M., Dai, Y., Boyd, J. M., Outten, F. W. *Biochemistry* (2014) 53, 5834-5847.
7. Lill, R., Freibert, S. A. *Annu Rev Biochem* (2020)
8. Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., Rouhier, N. *J Biol Inorg Chem* (2018) 23, 545-566.
9. Iwasaki, T. *Archaea* (2010) 2010, 842639.
10. Pagnier, A., Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (2015) 1853, 1457-1463.
11. Boniecki, M. T., Freibert, S. A., Muhlenhoff, U., Lill, R., Cygler, M. *Nat Commun* (2017) 8, 1287.
12. Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C. L., Winn, A. M., Barondeau, D. P. *Biochemistry* (2014) 53, 4904-4913.
13. Cory, S. A., Van Vranken, J. G., Brignole, E. J., Patra, S., Winge, D. R., Drennan, C. L., Rutter, J., Barondeau, D. P. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114, E5325-E5334.
14. Fox, N. G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H. J., Martelli, A., Nabhan, J. F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W. W., Han, S. *Nat Commun* (2019) 10, 2210.
15. Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A. B., Botzanowski, T., Muller, C. S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schunemann, V., Cianferani, S., Sizun, C., Toledano, M. B., D'Autreaux, B. *Nature Communications* (2019) 10, 3566.
16. Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J. P., Grandas, A., Toledano, M. B., D'Autreaux, B. *Nat Commun* (2015) 6, 5686.
17. Srour, B., Gervason, S., Monfort, B., D'Autreaux, B. *Inorganics* (2020) 8, 55.
18. Webert, H., Freibert, S. A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Muhlenhoff, U., Banci, L., Lill, R. *Nat Commun* (2014) 5, 5013.
19. Johnson, D. C., Unciuleac, M. C., Dean, D. R. *J Bacteriol* (2006) 188, 7551-7561.
20. Yoon, H., Knight, S. A., Pandey, A., Pain, J., Turkarslan, S., Pain, D., Dancis, A. *PLoS Genet* (2015) 11, e1005135.
21. Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E., Culotta, V. C. *J Mol Biol* (1999) 294, 897-907.
22. Tanaka, N., Yuda, E., Fujishiro, T., Hirabayashi, K., Wada, K., Takahashi, Y. *Mol Microbiol* (2019) 112, 1769-1783.
23. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., Johnson, M. K. *Annual Review of Biochemistry* (2005) 74, 247-281.
24. Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Ollagnier de Choudens, S., Barras, F., Py, B. *PLoS genetics* (2015) 11, e1005134.
25. Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R., Johnson, M. K. *Biochemistry* (2000) 39, 7856-7862.
26. Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., Vickery, L. E. *Biochemistry* (2011) 50, 9641-9650.
27. Foster, M. W., Mansy, S. S., Hwang, J., Penner-Hahn, J. E., Surerus, K. K., Cowan, J. A. *Journal of the American Chemical Society* (2000) 122, 6805-6806.
28. Marinoni, E. N., de Oliveira, J. S., Nicolet, Y., Amara, P., Dean, D. R., Fontecilla-Camps, J. C. *Angew Chem Int Ed Engl* (2012) 51, 5439-5442.
29. Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., Takahashi, Y. *Journal of Molecular Biology* (2008) 383, 133-143.
30. Ramelot, T. A., Cort, J. R., Goldsmith-Fischman, S., Kornhaber, G. J., Xiao, R., Shastry, R., Acton, T. B., Honig, B., Montelione, G. T., Kennedy, M. A. *Journal of Molecular Biology* (2004) 344, 567-583.
31. Iannuzzi, C., Adrover, M., Puglisi, R., Yan, R., Temussi, P. A., Pastore, A. *Protein Science* (2014) 23, 1208-1219.
32. Kim, J. H., Fuzery, A. K., Tonelli, M., Ta, D. T., Westler, W. M., Vickery, L. E., Markley, J. L. *Biochemistry* (2009) 48, 6062-6071.
33. Dzul, S. P., Rocha, A. G., Rawat, S., Kandedgedara, A., Kusowski, A., Pain, J., Murari, A., Pain, D., Dancis, A., Stemmler, T. L. *Metalomics* (2017) 9, 48-60.
34. Lewis, B. E., Mason, Z., Rodrigues, A. V., Nuth, M., Dizin, E., Cowan, J. A., Stemmler, T. L. *Metalomics* (2019) 11, 1820-1835.
35. Rodrigues, A. V., Kandedgedara, A., Rotondo, J. A., Dancis, A., Stemmler, T. L. *Biometals* (2015) 28, 567-576.
36. Patra, S., Barondeau, D. P. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116, 19421-19430.
37. Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1998) 95, 6803.

38. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., Rugolo, M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) 326, 799-804.
39. Slonczewski, J. L., Rosen, B. P., Alger, J. R., Macnab, R. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1981) 78, 6271.
40. Hickey, E. W., Hirshfield, I. N. *Applied and Environmental Microbiology* (1990) 56, 1038-1045.
41. Weitschies, W., Müller, L., Grimm, M., Koziol, M. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2021) 113853.
42. Shin, J., Jin, Y.-S., Park, Y.-C., Park, J.-B., Lee, Y.-O., Kim, S.-K., Kweon, D.-H. *Metabolic Engineering* (2021) 67, 277-284.
43. Clore, G. M., Iwahara, J. *Chemical Reviews* (2009) 109, 4108-4139.
44. Otting, G. *Annual Review of Biophysics* (2010) 39, 387-405.
45. Chandrasekaran, P., Chiang, K. P., Nordlund, D., Bergmann, U., Holland, P. L., DeBeer, S. *Inorganic Chemistry* (2013) 52, 6286-6298.
46. Randall, C. R., Shu, L., Chiou, Y.-M., Hagen, K. S., Ito, M., Kitajima, N., Lachicotte, R. J., Zang, Y., Que, L. *Inorganic Chemistry* (1995) 34, 1036-1039.
47. Westre, T. E., Kennepohl, P., DeWitt, J. G., Hedman, B., Hodgson, K. O., Solomon, E. I. *Journal of the American Chemical Society* (1997) 119, 6297-6314.
48. Kowalska, J. K., Hahn, A. W., Albers, A., Schiewer, C. E., Bjornsson, R., Lima, F. A., Meyer, F., DeBeer, S. *Inorg Chem* (2016) 55, 4485-4497.
49. Tsai, Y.-F., Luo, W.-I., Chang, J.-L., Chang, C.-W., Chuang, H.-C., Ramu, R., Wei, G.-T., Zen, J.-M., Yu, S. S. F. *Scientific Reports* (2017) 7, 8369.
50. Tsai, M. C., Tsai, F. T., Lu, T. T., Tsai, M. L., Wei, Y. C., Hsu, I. J., Lee, J. F., Liaw, W. F. *Inorg Chem* (2009) 48, 9579-9591.
51. Albers, A., Demeshko, S., Pröpper, K., Dechert, S., Bill, E., Meyer, F. *Journal of the American Chemical Society* (2013) 135, 1704-1707.
52. Gordon, J. B., Vilbert, A. C., DiMucci, I. M., MacMillan, S. N., Lancaster, K. M., Moënné-Loccoz, P., Goldberg, D. P. *Journal of the American Chemical Society* (2019) 141, 17533-17547.
53. Komuro, T., Matsuo, T., Kawaguchi, H., Tatsumi, K. *Inorganic Chemistry* (2003) 42, 5340-5347.
54. McDonald, A. R., Bukowski, M. R., Farquhar, E. R., Jackson, T. A., Koehntop, K. D., Seo, M. S., De Hont, R. F., Stubna, A., Halfen, J. A., Münck, E., Nam, W., Que, L. *Journal of the American Chemical Society* (2010) 132, 17118-17129.
55. Gordon, J. B., McGale, J. P., Prendergast, J. R., Shirani-Sarmazeh, Z., Siegler, M. A., Jameson, G. N. L., Goldberg, D. P. *Journal of the American Chemical Society* (2018) 140, 14807-14822.
56. Randall, C. R., Zang, Y., True, A. E., Que, L., Charnock, J. M., Garner, C. D., Fujishima, Y., Schofield, C. J., Baldwin, J. E. *Biochemistry* (1993) 32, 6664-6673.
57. Scott, R. A., Wang, S., Eidsness, M. K., Kriauciunas, A., Frolik, C. A., Chen, V. J. *Biochemistry* (1992) 31, 4596-4601.
58. Hagen, W. R. *Biomolecular EPR Spectroscopy*. 1st edn, 248 (CRC Press, 2008).
59. Hendrich, M. P., Debrunner, P. G. *Biophysical Journal* (1989) 56, 489-506.
60. Hendrich, M. P., Debrunner, P. G. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) (1988) 78, 133-141.
61. Hagen, W. *Biochimica et biophysica acta* (1982) 708, 82-98.
62. Münck, E., Surerus, K. K., Hendrich, M. P. *Methods Enzymol* (1993) 227, 463-479.
63. Harman, W. H., Harris, T. D., Freedman, D. E., Fong, H., Chang, A., Rinehart, J. D., Ozarowski, A., Sougrati, M. T., Grandjean, F., Long, G. J., Long, J. R., Chang, C. J. *Journal of the American Chemical Society* (2010) 132, 18115-18126.
64. Cremades, E., Ruiz, E. *Inorganic Chemistry* (2011) 50, 4016-4020.
65. Atanasov, M., Ganyushin, D., Pantazis, D. A., Sivalingam, K., Neese, F. *Inorganic Chemistry* (2011) 50, 7460-7477.
66. Mathies, G., Chatziefthimiou, S. D., Maganas, D., Sanakis, Y., Sottini, S., Kyritsis, P., Groenen, E. J. J. *Journal of Magnetic Resonance* (2012) 224, 94-100.
67. Lemerrier, G., Mulliez, E., Brouca-Cabarrecq, C., Dahan, F., Tuchagues, J. P. *Inorg Chem* (2004) 43, 2105-2113.
68. McLaughlin, M. P., Retegan, M., Bill, E., Payne, T. M., Shafaat, H. S., Peña, S., Sudhamsu, J., Ensign, A. A., Crane, B. R., Neese, F., Holland, P. L. *Journal of the American Chemical Society* (2012) 134, 19746-19757.
69. Kleczewska, M., Grabinska, A., Jelen, M., Stolarska, M., Schilke, B., Marszalek, J., Craig, E. A., Dutkiewicz, R. *Int J Mol Sci* (2020) 21,
70. Dutkiewicz, R., Marszalek, J., Schilke, B., Craig, E. A., Lill, R., Muhlenhoff, U. *J Biol Chem* (2006) 281, 7801-7808.
71. Kim, J. H., Tonelli, M., Markley, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012) 109, 454.
72. Majewska, J., Ciesielski, S. J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., Song, J. Y., Marszalek, J., Craig, E. A., Dutkiewicz, R. *J Biol Chem* (2013) 288, 29134-29142.
73. Kim, J. H., Frederick, R. O., Reinen, N. M., Troupis, A. T., Markley, J. L. *Journal of the American Chemical Society* (2013) 135, 8117-8120.
74. Hall, D. A., Vander Kooi, C. W., Stasik, C. N., Stevens, S. Y., Zuiderweg, E. R. P., Matthews, R. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2001) 98, 9521.
75. Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., Laue, E. D. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (2005) 59, 687-696.
76. Ravel, B., Newville, M. *Journal of Synchrotron Radiation* (2005) 12, 537-541.
77. Chiang, K. P., Barrett, P. M., Ding, F., Smith, J. M., Kingsley, S., Brennessel, W. W., Clark, M. M., Lachicotte, R. J., Holland, P. L. *Inorg Chem* (2009) 48, 5106-5116.
78. Ibrahim, I. M., Wu, H., Ezhov, R., Kayanja, G. E., Zakharov, S. D., Du, Y., Tao, W. A., Pushkar, Y., Cramer, W. A., Puthiyaveetil, S. *Communications Biology* (2020) 3, 13.
79. Gunnlaugsson, H. P. *Hyperfine Interactions* (2016) 237, 79.

80. Abragam, A., Bleaney, B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. (Oxford University Press, 1970).
81. Stoll, S., Schweiger, A. *Journal of Magnetic Resonance* (2006) 178, 42-55.

Supplementary Information

Iron insertion in the assembly site of ISCU scaffold proteins is a conserved process to initiate Fe-S cluster biosynthesis.

Srouf, Gervason & *al*

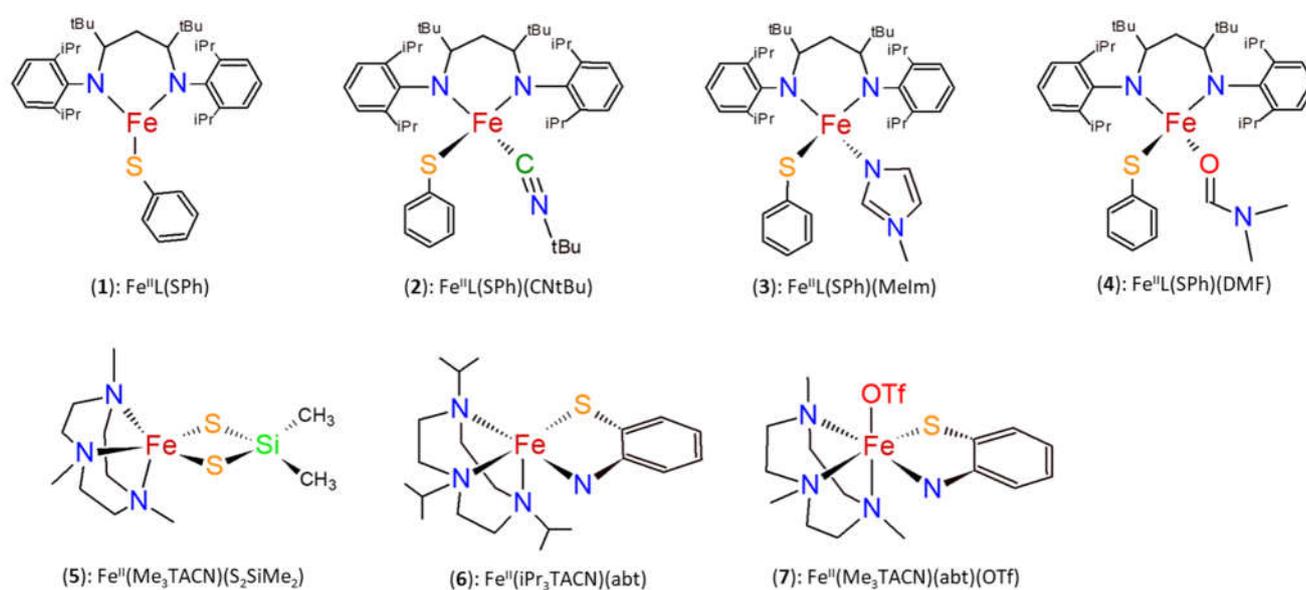


Figure S1: Structure of selected 3-, 4-, 5- and 6-coordinated non-heme high spin Fe^{II} complexes by C, N, O, S donating atoms in trigonal, tetrahedral, trigonal bipyramid and octahedral geometries. Compounds (1): Fe^{II}L^{tBu}(SPh), (2): Fe^{II}L^{tBu}(SPh)(CNtBu), (3): Fe^{II}L^{tBu}(SPh)(MeIm), (4): Fe^{II}L^{tBu}(SPh)(DMF), (5): Fe^{II}(Me₃TACN)(S₂SiMe₂), (6): Fe^{II}(iPr₃TACN)(abt), (7): Fe^{II}(Me₃TACN)(abt)(OTf).

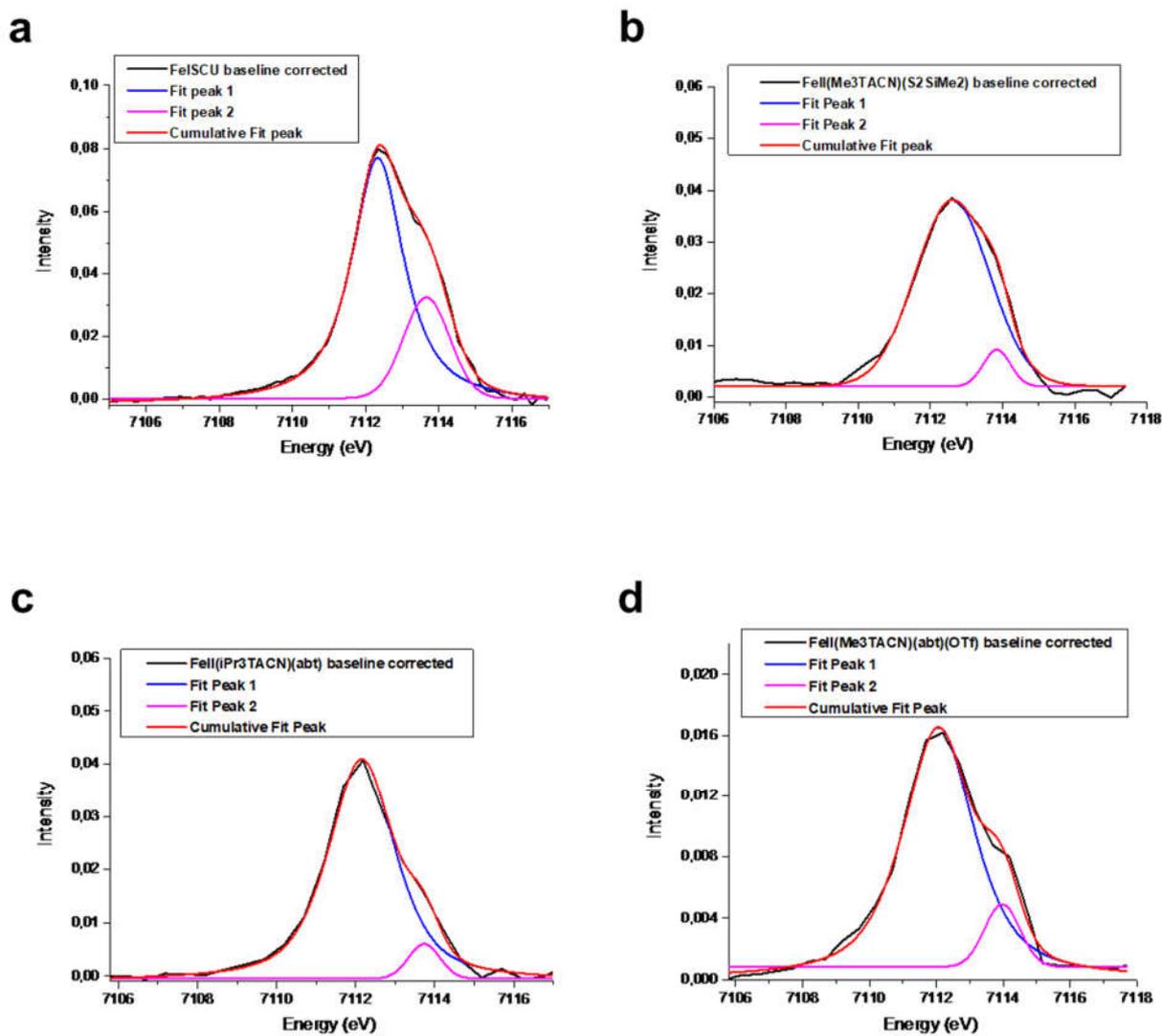


Figure S2: Deconvoluted XANES spectra in the pre-edge region
Deconvoluted spectra of Fe-ISCO (a) and complexes (5) to (7) (b-d) as indicated.

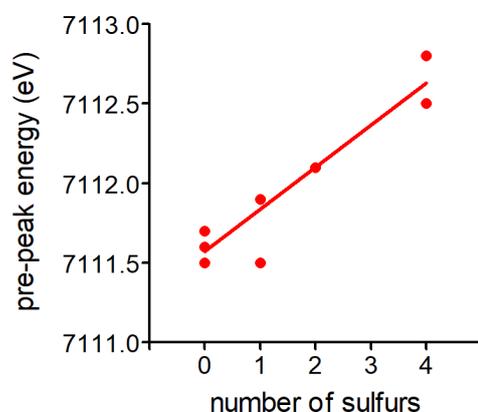


Figure S3: Correlation of energy of the $1s \rightarrow 3d$ transition with the number of sulfurs.

Plot of the energy of first pre-edge peak as a function of the number of sulfurs within the 4-coordinated Fe^{II} model complexes from Table 2.

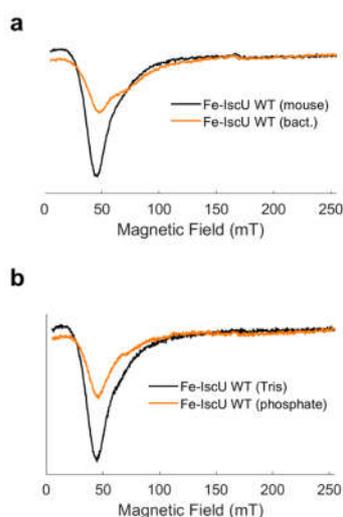


Figure S4: EPR spectra of WT *Mm* and *Ec* ISCU in Tris and phosphate buffers.

(a) Parallel-mode X-band EPR spectra of WT *Mm* (mouse) and *Ec* (bact.) ISCU proteins (0.7 mM) prepared in Tris buffer and incubated with 0.7 eq. of ferrous iron (0.5 mM). (b) Parallel-mode X-band EPR spectra of WT *Mm* ISCU (1.3 mM) prepared in Tris and phosphate buffers and incubated with 0.6 eq. of ferrous iron (0.8 mM). EPR recording parameters: temperature, 7 K; microwave frequency, 9.38 GHz; microwave power, 1 mW; modulation amplitude, 1 mT.

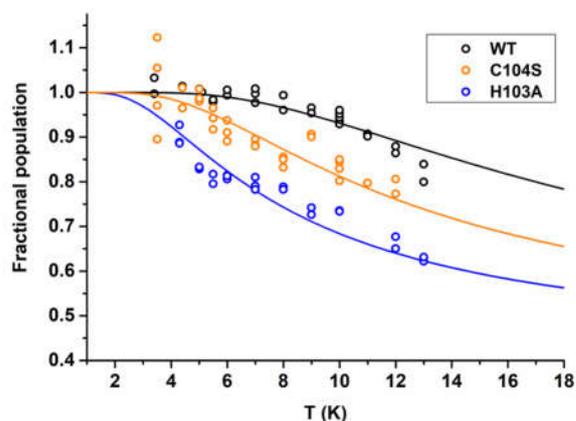


Figure S5: Temperature dependence of the “ $g \sim 14$ ” signal associated to Fe^{II} -ISCU in *Mm* ISCU WT, C104S and H103A mutants.

The normalized product of signal amplitude (base-to-trough) and temperature that is proportional to the fractional population of the non-Kramers “ $M_s = \pm 2$ ” doublet is plotted as a function of temperature. Fits correspond to statistical Boltzmann distribution of the “ $M_s = \pm 2$ ” assuming an axial zero field splitting with $D = -6.5 \text{ cm}^{-1} \pm 1$ (WT), $-4.5 \text{ cm}^{-1} \pm 1$ (C104S) and $-2 \text{ cm}^{-1} \pm 1$ (H103A)

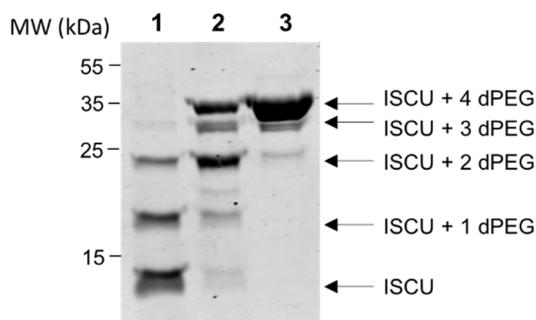


Figure S6: oxidation state of the cysteine residues in the H103A mutant.

Samples of H103A were analyzed by alkylation to assess the redox state of the cysteine residues using the maleimide derivative Mal-dPEG (MW = 2.3 kDa). The reduced cysteine(s) in ISCU will be alkylated by Mal-dPEG, thereby inducing a shift of the band to higher molecular weights producing distinct band depending on the number of alkylated cysteines, as indicated on the figure (ISCU + n dPEG). (1, 2) analysis of samples of H103A from previous studies that were prepared in Tris (1) and phosphate (2) buffer. The sample in Tris was analyzed by Mössbauer spectroscopy.¹ (3) New sample of H103A prepared in Tris under more stringent reducing conditions and analyzed herein.

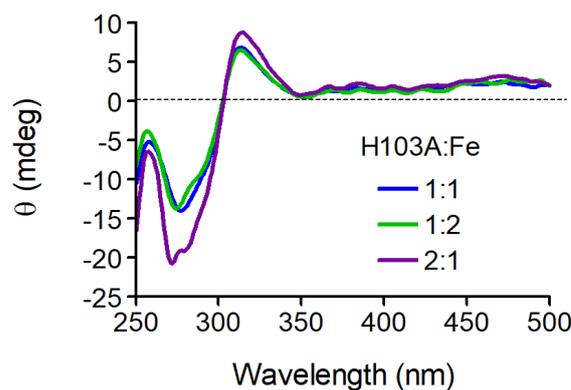


Figure S7: CD spectra of the H103A mutant at different protein to iron ratios.

The H103A mutant (100 μM or 200 μM) was incubated with one or two equivalents of Fe^{2+} ions (100 μM and 200 μM). Protein to iron ratios (H103A:iron) are indicated on the figure.

Supplementary tables

Supplementary Table 1. Sets of Mössbauer parameters for the H103A mM ISCU

mM ISCU	Fit	species	T (K)	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Γ (mm/s)	% Area
H103A	Set 1	S ₁	77	0.81 (1)	3.08 (1)	0.47 (1)	73 (2)
		S ₂		0.81 (1)	3.65 (1)	0.30 (1)	27 (2)
	Set 2	S ₁	77	0.93 (1)	3.24 (1)	0.48 (1)	65 (2)
		S ₂		0.66 (1)	3.31 (1)	0.33 (1)	35 (2)

Supplementary Text

Supplementary text 1

A second set of parameters (**SI Table 1**, set 2) could fit the Mössbauer spectra of the H103A ISCU mutant. This set includes two Fe^{II} species, S₁ (65 %) and S₂ (35 %) with isomeric shifts consistent with iron centers coordinated by one or two sulfurs for S₁ ($\delta = 0.93 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) and by four sulfurs for S₂ ($\delta = 0.66 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$).^{1,2} However, as there are only three cysteine residues in the assembly site, a coordination by four sulfurs is not realistic.

References

- Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A. B., Botzanowski, T., Muller, C. S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schunemann, V., Cianferani, S., Sizun, C., Toledano, M. B., D'Autreaux, B. *Nature Communications* (2019) 10, 3566.
- McLaughlin, M. P., Retegan, M., Bill, E., Payne, T. M., Shafaat, H. S., Peña, S., Sudhamsu, J., Ensign, A. A., Crane, B. R., Neese, F., Holland, P. L. *Journal of the American Chemical Society* (2012) 134, 19746-19757.

2.3 Résumé de l'article #3

2.3.1 Insertion du fer et effet du pH et de la nature du tampon

Nous avons dans un premier temps généré les formes apo des protéines ISCU provenant de *E. coli*, *C. thermophilum*, *H. sapiens* et *M. musculus*. Ces formes apo-ISCU ont été purifiées par SEC ce qui nous a permis d'analyser l'état oligomérique de ces protéines. Les profils d'élution montrent la présence d'une forme oligomérique et une forme monomérique pour chaque ISCU (**Figure 1a article#3**).

Nous avons dans un premier temps analysé les formes monomériques. Les protéines apo-ISCU monomères ont été incubées avec des ions Fe^{2+} et analysées par CD. Les spectres CD de ces quatre ISCU sont quasiment superposables. Ils présentent tous des bandes d'absorptions à 270, 310 et 340 nm caractéristiques de la liaison cystéine $\rightarrow Fe^{2+}$ (**Figure 1b article#3**). Ces données suggèrent donc que l'insertion du fer au sein du site métallique contenant des cystéines d'ISCU est un mécanisme conservé à travers les organismes.

Ces données sont cependant en contradiction avec les données publiées par l'équipe de Timothy Stemmler. En effet, les études par absorption X réalisées par son équipe sur différentes ISCU provenant de *T. maritima*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* et *H. sapiens* ont montré que le fer se lie dans un site exclusivement composé par des ligands oxygènes ou azotes (Lewis & al, 2019). Les auteurs ont également montré que la fixation du fer dans ce site permettait la formation d'un centre $[2Fe2S]$ lié quant à lui dans le site métallique d'ISCU composé de ligands cystéines (Lewis & al, 2019). Cependant, les reconstitutions ont été réalisées en absence du couple FDX2/FDXR remplacé par du DTT et un excès de L-cystéine conduisant à la formation de centres Fe-S par la voie thiol-dépendante, ce qui n'est pas physiologiquement pertinent comme nous l'avons vu précédemment. Nous avons alors essayé de comprendre comment il était possible d'obtenir des résultats totalement différents.

Nous avons remarqué que la nature du tampon ainsi que son pH étaient différents des nôtres. Dans leurs études, les auteurs préparent la protéine apo-ISCU dans un tampon HEPES à pH 7,0 alors que nous utilisons un tampon Tris à pH 8,0, car le pH physiologique de la mitochondrie est de 8,0. De plus, leur méthode de préparation d'apo-ISCU inclut de nombreux cycles de concentration/dilution pouvant conduire à l'agglomération de la protéine. Nous avons dans un premier temps analysé l'effet du pH et la nature du tampon sur l'insertion du fer dans le site métallique d'ISCU par CD. Lorsque la protéine est préparée dans un tampon HEPES à pH 7,0, on observe une forte diminution de l'ordre de 65 % à 75 % de la quantité de fer liés aux ISCU de *M. musculus* et *E. coli* par rapport à un tampon à pH 8,0 (**Figure 1c article#3**). La nature du tampon joue également un rôle prépondérant dans l'insertion du fer. En effet, dans un tampon phosphate à pH 8,0, la quantité de fer lié à ISCU diminue fortement par rapport aux tampons Tris et HEPES (**Figure 1c article#3**). Cet effet du phosphate est également retrouvé

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

lorsque l'on analyse ISCU *M. musculus* par spectroscopie Mössbauer (**Figure 57**). Lorsque apo-ISCU est incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} dans du tampon phosphate, la principale composante d'ISCU dans du tampon Tris correspondant à du fer(II) dans un environnement contenant des cystéines à un déplacement isomérique $\delta = 0,89 \text{ mm.s}^{-1}$ est fortement réduite à 16 %. Les deux autres composantes $\delta = 1,26 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\delta = 1,29 \text{ mm.s}^{-1}$ correspondent soit à du fer lié non spécifiquement à la protéine, soit à du fer libre dans le tampon et deviennent majoritaire.

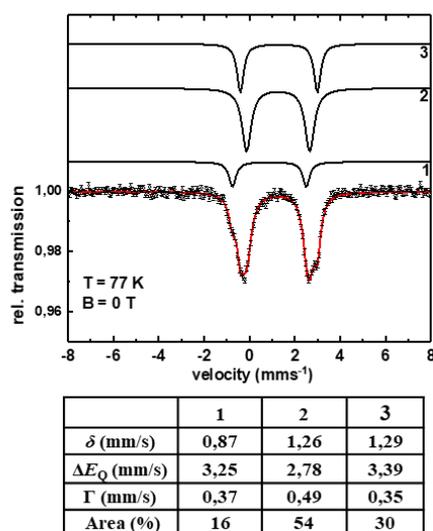


Figure 57 Effet du tampon sur l'insertion du fer par spectroscopie Mössbauer. Spectre Mössbauer d'apo-ISCU de *M. musculus* incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} enrichie en ^{57}Fe dans le tampon phosphate.

Nous avons également évalué la capacité de la forme oligomère d'ISCU de *M. musculus* à lier le fer ainsi que l'impact de plusieurs cycles de concentration/dilution. Nous avons constaté qu'à pH 8,0, la forme oligomère lie 70% moins de fer que la forme monomère et qu'à pH 7,0 elle ne lie plus du tout le fer (**Figure 1d article#3**). Après plusieurs cycles de concentration/dilution de la forme monomère à pH 7,0, la capacité de fixation du fer est également diminuée, d'environ 50 %, ce qui suggère que ces étapes favorisent la formation d'oligomère (**Figure 1d article#3**).

Nous avons ensuite testé la capacité des protéines ISCU à assembler des centres Fe-S et l'effet du pH dans un système reconstitué incluant la ferrédoxine. Nous avons constaté que toutes les ISCU (*E. coli*, *C. thermophilum*, *H. sapiens* et *M. musculus*) chargées en fer forment des centres Fe-S à des vitesses initiales similaires à pH 8,0 (**Figure 2a article#3**). Pour étudier l'effet du pH, nous avons utilisé le même tampon afin d'exclure un effet de la nature du tampon. Nous avons utilisé un tampon Tris équilibré à différents pH, entre 8,0 et 7,2, et nous avons comparé les protéines ISCU de *H. sapiens* et *E. coli*. Nous avons observé que la diminution du pH de 8,0 à 7,2 fait diminuer à la fois la vitesse d'assemblage et la quantité de centres Fe-S formés (**Figure 2b,c,d,e article#3**). Un effet plus important est observé sur la

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

vitesse d'assemblage qui diminue d'environ 50 à 70 %, aussi bien pour *H. sapiens* qu'*E. coli*. Cet effet est du même ordre de grandeur que l'effet du pH sur la quantité de fer inséré initialement dans ISCU (**Figure 2f,g article#3**). Bien qu'il y ait potentiellement d'autres étapes affectées par le pH, ces données suggèrent un lien entre insertion de fer dans le site d'assemblage et activité de biosynthèse des centres Fe-S.

Ces données posent également la question de la physiologie, car le pH intracellulaire est variable selon les espèces et leur environnement. Chez les eucaryotes, la machinerie ISC est localisée dans la matrice mitochondriale où le pH est maintenu aux alentours de 8,0. Les bactéries *E. coli* colonisent différentes parties de l'intestin où le pH peut être très variable, entre 6,0 et 8,5. Le pH est plus acide dans l'intestin grêle car c'est la partie la plus proche de l'estomac, puis devient de plus en plus basique jusqu'au côlon. Nos données suggèrent, étonnamment, que l'activité de biogénèse des centres Fe-S n'a pas la même efficacité selon la localisation des souches *E. coli* dans l'intestin. Les souches entérohémorragiques d'*E. coli*, qui sont parmi les plus virulentes, colonisent principalement le côlon qui est la partie la plus basique (7,5-8,5). Une activité de biosynthèse plus efficace à pH 8,0 pourrait donc potentiellement être liée à la virulence de ces souches.

2.3.2 Localisation du centre métallique d'ISCU

L'analyse des perturbations induites par le paramagnétisme du centre Fe(II) d'ISCU sur le spectre RMN nous a permis de le localiser. Le paramagnétisme du centre Fe(II) entraîne un élargissement des signaux à proximité du fer en raison de l'augmentation de la relaxation paramagnétique (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) et une modification des déplacements chimiques (pseudo-contact shift, PCS) pour ceux plus éloignés. La cartographie des PRE montre la disparition des signaux dans les régions Ala32-Val38, Thr58-Ala71, Lys101-Asp110 qui incluent les résidus conservés du site d'assemblage Cys35, Asp37, Cys61, His103 et Cys104 (**Figure 3b article#3**). Pour analyser les PCS de la forme Fe-ISCU nous avons utilisé la forme Zn-ISCU comme référence. Les PCS sont sensibles à la fois à la distance avec le centre paramagnétique et à l'orientation par rapport au tenseur de susceptibilité paramagnétique. L'analyse des PCS montre qu'ils sont tous à proximité des résidus conservés du site d'assemblage. Cette analyse montre donc que le fer se lie dans le site d'assemblage d'ISCU.

2.3.3 Détermination du site de liaison du fer dans ISCU par spectroscopie XAS

Pour identifier les ligands liant le fer nous avons analysé la protéine Fe-ISCU par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS). Ces études ont été conduites par Batoul Srour, j'ai participé à la préparation des échantillons et à l'enregistrement des spectres sur la ligne SAMBA à SOLEIL (Saclay).

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Un spectre d'absorption X peut être découpé en deux parties distinctes donnant deux types d'informations différentes. La partie EXAFS (Extended X-Ray-Absorption Fine-Structure) permet d'obtenir des informations sur la nature, le nombre et la distance des ligands par rapport au métal. La partie XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure) permet quant à elle d'obtenir des informations sur la structure électronique et la symétrie du site métallique. L'analyse des spectres EXAFS a mis en évidence une coordination par 4 atomes : deux oxygènes ou azotes centrés à 2.05 Å et deux soufres centrés à 2.34 Å. L'analyse des spectres XANES a montré que le fer adopte une géométrie proche de la symétrie tétraédrique.

2.3.4 Détermination des ligands du fer dans ISCU

Dans l'article #2, nous avons trouvé que les substitutions de Cys35, Asp37 et Cys61 conduisaient à des mutants incapables de lier du fer lorsqu'ils étaient incubés avec un équivalent de fer. Les résultats des substitutions de His103 et Cys104 étaient moins clairs. La cystéine 104 étant le résidu accepteur du persulfure une interaction directe avec le fer n'était pas exclue pour expliquer le caractère fer-dépendant du transfert de persulfure. Dans le mutant C104S, du fer est toujours capable de se fixer au site d'assemblage mais l'affinité du fer est diminuée, ce qui suggère soit que ce résidu est un ligand du fer (remplacé par un autre ligand dans le mutant C104S) soit qu'il est très proche du fer et donc capable d'influencer les propriétés de fixation du fer. De plus, les analyses Mössbauer réalisées dans l'article #2 ont montré la présence de deux espèces avec des déplacements isomériques différents : une espèce majoritaire (63 % du signal) possédant un déplacement isomérique $\delta = 0,87 \text{ mm.s}^{-1}$ identique à celui de ISCU WT et une espèce minoritaire (37 %) avec un déplacement isomérique $\delta = 1,23 \text{ mm.s}^{-1}$ correspondant à du fer lié par des atomes d'oxygènes et/ou azotes, pouvant correspondre soit à du fer lié dans ISCU soit à du fer libre. La présence d'une seconde espèce pouvant avoir une influence sur la précision dans la détermination des paramètres, il était difficile de conclure si les paramètres étaient modifiés dans le mutant C104S et donc si Cys104 était effectivement proche du métal. Dans le mutant H103A, alors que la spectroscopie Mössbauer indiquait que le fer n'était pas lié dans un site contenant des résidus cystéines, un signal CD pouvant correspondre à du fer dans le site d'assemblage avait été observé. Ces interrogations nous ont conduit à étudier plus en détail ces deux mutants.

Une nouvelle analyse Mössbauer du mutant ISCU C104S cette fois-ci incubé avec 0,5 équivalent de Fe^{2+} montre la présence d'une seule espèce avec des paramètres identiques (déplacement isomérique et écart quadripolaire) à l'espèce majoritaire précédemment détectée dans la protéine sauvage, ce qui suggère que la substitution de Cys104 ne modifie ni la nature des ligands du fer, ni la géométrie de ce site (**Figure 5b article#3**). Cependant l'analyse par spectroscopie RPE nous a montré que le mutant C104S a une influence sur les propriétés électroniques du site à fer. En mode parallèle qui permet de détecter les systèmes à spin entier, le spectre RPE de la protéine ISCU sauvage incubée avec

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

0.7 équivalent de fer montre un signal à $g = 14,9$ caractéristique d'un centre Fe(II) haut-spin ($S = 2$). Le signal RPE du mutant ISCU C104S est légèrement modifié avec une valeur de $g = 13,4$ (**Figure 5c article#3**). Ces résultats indiquent que la structure électronique du fer est modifiée, ce qui suggère que la cystéine 104 est très proche du métal, ce qui pourrait expliquer son effet stabilisateur.

Nous avons ensuite réétudié le mutant H103A. Nous avons dans un premier temps analysé l'état redox des cystéines dans l'échantillon Mössbauer de l'article #2 du mutant H103A par la méthode ARBS. Nous avons constaté que les résidus cystéines étaient tous oxydés, ce qui naturellement empêche le fer de se lier au site d'assemblage (**Figure supplémentaire 6 article#3**). Nous avons donc re préparé un mutant H103A en présence d'un excès de DTT tout au long de la préparation, notamment au cours de la concentration en boîte à gants avant de l'éliminer par dessalage afin de maintenir tous les résidus cystéines dans un état réduit. Nous avons obtenu un mutant dans lequel les cystéines étaient réduites. À partir de cette nouvelle préparation nous avons réalisé des analyses par CD, Mössbauer et RPE. Le spectre CD montre des absorptions caractéristiques d'un fer coordonné par des cystéines mais de plus faible intensité que celui pour ISCU sauvage (**Figure 5d article#3**). L'analyse par spectroscopie RPE montre un signal à $g = 9,9$ indiquant une large modification dans la structure électronique de l'atome de fer (**Figure 5c article#3**). L'analyse par spectroscopie Mössbauer d'apo-ISCU H103A incubée avec 0,5 équivalent de Fe^{2+} montre un spectre très différent de celui obtenu précédemment avec la forme où les cystéines étaient oxydées (**Figure 5e article#3**). Les données expérimentales peuvent être ajustées par deux jeux de paramètres différents avec deux espèces différentes dans chaque jeu de paramètres. Le premier jeu de paramètres conduit à une espèce avec un déplacement isomérique $\delta = 0,93 \text{ mm.s}^{-1}$ (65 %) et une seconde espèce avec un déplacement isomérique $\delta = 0,66 \text{ mm.s}^{-1}$ (35%), ce qui correspondrait à un centre Fe^{2+} coordonné par 4 résidus cystéines. Or, cela n'est pas réaliste car uniquement 3 cystéines sont localisées dans le site d'assemblage d'ISCU. Le deuxième jeu de paramètres comprend deux espèces avec des déplacements isomériques identiques mais avec des écarts quadrupolaires légèrement différents. Le déplacement isomérique de ces deux espèces, $\delta = 0,81 \text{ mm.s}^{-1}$, est plus petit que celui d'ISCU sauvage, et pourrait donc indiquer la présence d'une cystéine supplémentaire, cependant la différence est faible et donc il n'est pas possible de définitivement conclure à la présence d'une cystéine supplémentaire. Nous avons donc étudié l'intensité des bandes de transfert de charge qui peuvent donner une idée du nombre de résidus cystéines liant le fer. L'intensité du spectre UV-visible dans la région LMCT (200-400 nm) augmente dans le mutant H103A comparé à ISCU sauvage, suggérant effectivement la présence de résidus cystéines supplémentaires (**Figure 5f article#3**). Globalement ces résultats sont compatibles avec une coordination par 3 résidus cystéines. Une coordination par 2 résidus cystéines serait envisageable si le résidu aspartate Asp37 se liait au fer de manière bidentate. Cependant, dans la littérature ce mode de liaison est caractérisé par une forte diminution de l'écart quadrupolaire de l'ordre de 1 à 2 mm.s^{-1} , alors que dans notre cas l'écart quadrupolaire est uniquement diminué de 0,46 mm.s^{-1} par rapport à ISCU sauvage dans la première espèce et augmente dans la seconde espèce, ce qui

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

ne semble pas cohérent avec ce type de coordination. Ces résultats suggèrent donc que dans ce mutant, le fer est lié par trois cystéines. Nous avons conclu que la cystéine Cys104 vient prendre la place de l'histidine His103.

2.4 Effet du GSH et de la L-cystéine sur l'insertion du fer dans ISCU

Nous avons également testé l'effet du GSH et de la L-cystéine sur l'insertion du fer au sein d'ISCU car ce sont deux molécules physiologiques que l'on retrouve en grande quantité dans les cellules. Lorsque apo-ISCU est incubé avec un équivalent de Fe^{2+} en présence de 2 mM de GSH le signal LMCT ($\text{Cys-S} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) obtenu par CD diminue de 30 % (**Figure 58a**). En présence de 20 mM de GSH aucun signal n'est détecté. Les concentrations *in vivo* en GSH étant estimées entre 5 et 15 mM chez les eucaryotes supérieurs et jusqu'à 30 mM dans la levure (Montero & al, 2013 ; Ponsoero & al, 2017), ces résultats indiquent que cette molécule est capable de capter le fer empêchant ainsi son insertion au sein d'ISCU. Une perte de 35 % du signal est également observée en présence de 30 mM de L-cystéine (**Figure 58b**). La L-cystéine semble donc avoir une affinité plus faible pour le Fe^{2+} et la concentration utilisée est très supérieure à sa concentration physiologique. Nos résultats avec le GSH sont très surprenants, car ils suggèrent qu'*in vivo*, le GSH capte si fortement le fer qu'il ne peut pas être utilisé pour l'assemblage de centres Fe-S. Cependant, nous n'avons pas réalisé de reconstitution avec un excès de fer et avec la machinerie ISC pour voir si cet effet se répercute effectivement sur l'assemblage de centres Fe-S.

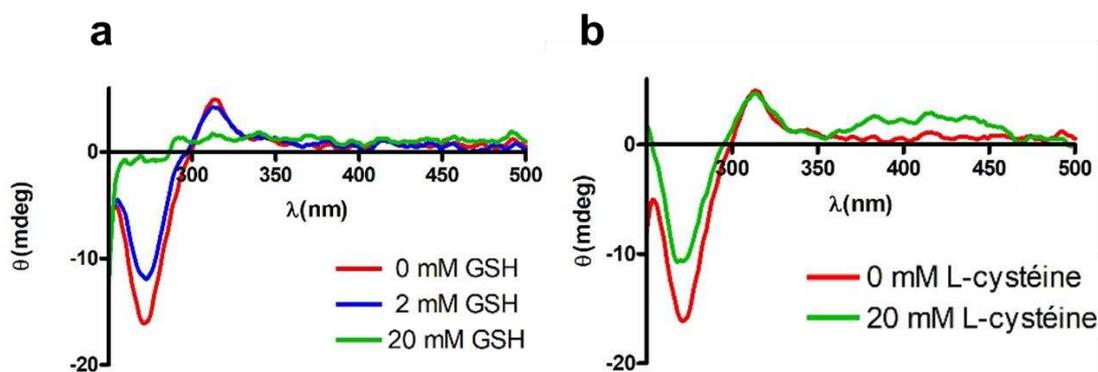


Figure 58 Effet du GSH et de la L-cystéine sur l'insertion du fer dans ISCU. **(a)** Spectres CD d'apo-ISCU incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} en absence (spectre rouge) ou présence de 2 mM ou 20 mM GSH (spectre bleu et vert respectivement). **(b)** Spectres CD d'apo-ISCU incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} en absence (spectre rouge) ou présence de 20 mM de L-cystéine (spectre vert).

2.5 Etude de la séquence d'insertion du fer et de formation du complexe NIA

Nous avons également cherché à comprendre si la séquence d'insertion de fer dans ISCU avait une importance pour la biosynthèse des centres Fe-S. Pour cela nous avons réalisé des cinétiques d'assemblage de centres Fe-S avec 3 méthodes différentes d'insertion. Ces cinétiques ont été réalisées par Nadine Trabelsi étudiante en master 2 que j'ai encadré durant ma thèse. Nous avons soit ajouté le fer en premier puis apo-ISCU et ensuite le complexe NIA, FXN, FDX2, FDXR et NADPH (**Figure 59 réaction 1**), qui correspond à la méthode par défaut que nous utilisons lors des réactions d'assemblage, soit apo-ISCU est incubée avec NIA, FXN, FDX2, FDXR et NADPH et le fer est ajouté en dernier (**Figure 59 réaction 2**), soit apo-ISCU est mélangée avec NIA et le fer est ajouté, puis les autres composants FXN, FDX2, FDXR et NADPH (**Figure 59 réaction 3**). Dans les 3 cas, la vitesse d'assemblage et la quantité de centres Fe-S formés sont très similaires, ce qui montre que l'arrivée du fer au sein d'ISCU peut se faire aussi bien dans ISCU libre qu'en complexe avec NFS1 et que la présence de FXN et des autres composants ne modifie pas non plus ce processus. Il est donc possible qu'il n'y ait pas de séquence prédéterminée pour la fixation du fer au sein d'ISCU permettant l'initiation de la formation des centres Fe-S.

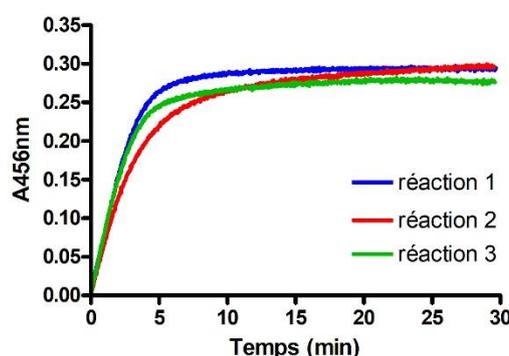


Figure 59 Effet de la séquence d'insertion du fer sur l'assemblage des centres Fe-S. Cinétique d'assemblage en conditions catalytiques suivie à 456 nm avec différentes méthodes d'insertion du fer réalisées dans les ordres suivants: 1) Fe, 2) apo-ISCU et 3) NIA, FXN, FDX2, FDXR, NADPH (**réaction 1**), 1) apo-ISCU, NIA, FXN, FDX2, FDXR, NADPH, 2) Fe (**réaction 2**) et 1) apo-ISCU, NIA, 2) Fe et 3) FXN, FDX2, FDXR, NADPH (**réaction 3**).

3. Discussion générale

Dans ce chapitre, nous avons étudié en détail la machinerie ISC eucaryote. Grâce aux études cinétiques et à la méthode ARBS nous avons pu décrypter le mécanisme d'assemblage étape par étape et avons établi un modèle de la biosynthèse des centres [2Fe2S]. Deux voies de synthèse sont possibles *in vitro*, une voie FDX2-dépendante lorsque le persulfure transféré à ISCU est réduit en sulfure par

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

FDX2, et une voie thiol dépendante dans laquelle le persulfure de NFS1 est réduit en sulfure par des thiols tels que le DTT, la L-cystéine et le GSH (**Figure 60**). En présence de zinc dans ISCU, c'est majoritairement par la voie thiol-dépendante que se forment les centres Fe-S. Cependant, la voie thiol-dépendante est très peu efficace et beaucoup plus lente que la voie FDX2-dépendante, car elle repose sur la libération d'ions sulfures en solution. Pour pouvoir entrer en compétition avec la voie FDX2, nous avons calculé que la réaction thiol-dépendante nécessiterait des concentrations de L-cystéine ou de GSH de l'ordre de 15 mM et 1 M respectivement, ce qui est très loin de leurs concentrations physiologiques. De plus, les ions sulfures en solution pouvant diffuser dans un contexte cellulaire vont rencontrer d'autres cibles et donc la probabilité de former des centres Fe-S sera extrêmement faible et non spécifique d'ISCU. Inversement, la réaction FDX2-dépendante est confinée dans ISCU et les ions sulfures ne sont pas libérés car leur formation est coordonnée à la présence du fer. Nous en concluons donc que la réaction thiol-dépendante n'est pas physiologiquement pertinente, à l'inverse de la réaction FDX2-dépendante qui décrit le processus physiologique d'assemblage.

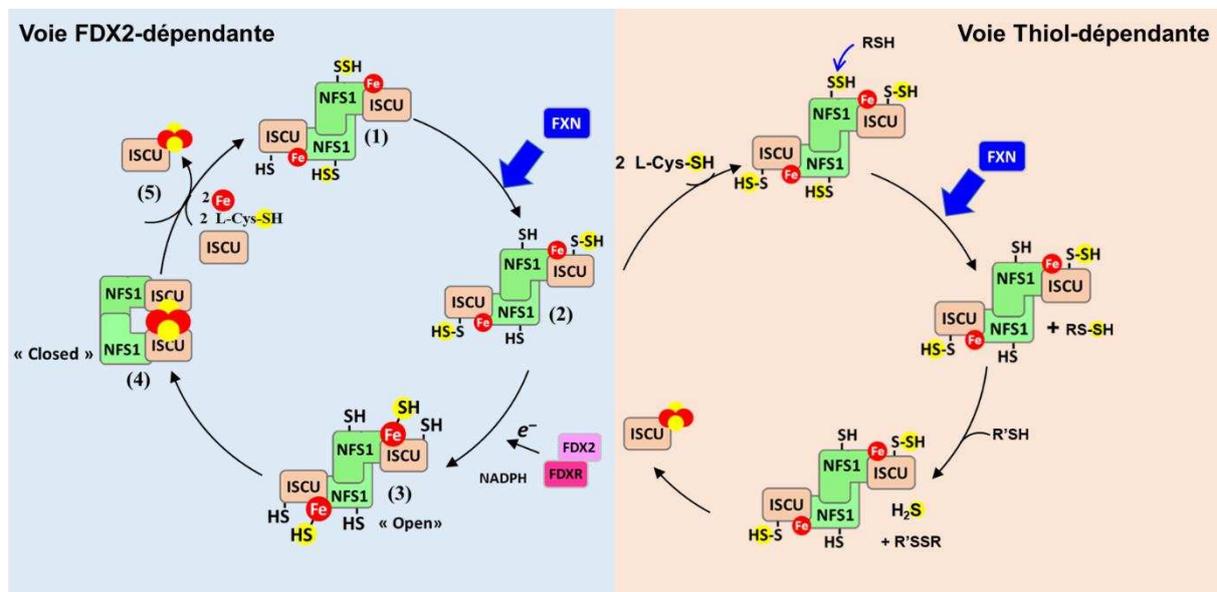


Figure 60 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par les voies FDX2- et thiol-dépendante. La formation de l'état intermédiaire 1 permet d'initier l'assemblage des centres Fe-S. Le persulfure préalablement formé sur NFS1 est transféré à ISCU générant ainsi l'état intermédiaire 2. Cette étape est fortement accélérée par la frataxine. Cet état intermédiaire 2 réagit avec le couple FDX2/FDXR qui réduit le persulfure d'ISCU menant à l'intermédiaire 3. Afin de former un centre binucléaire [2Fe2S], une dimérisation d'ISCU est nécessaire afin de mettre en commun les deux intermédiaires [1Fe1S]. Le centre [2Fe2S] pontant migre ensuite sur un monomère d'ISCU puis se dissocie du complexe pour être pris en charge par le système chaperon.

Description de la séquence d'assemblage étape par étape

Nous avons vu que les trois premières étapes de la réaction FDX2 dépendante (**Figure 61**) sont l'insertion de fer dans ISCU, la formation de persulfure par NFS1 et la formation d'un complexe NFS1-ISCU. Nos données montrent que Fe-ISCU aussi bien qu'apo-ISCU peuvent se fixer à NFS1 et que

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

l'insertion de fer peut survenir aussi bien dans ISCU libre que dans ISCU en complexe sans que cela n'influence ni la cinétique, ni l'efficacité de la réaction. Ces trois étapes semblent donc indépendantes, ce qui permet de définir au moins cinq voies différentes, selon l'ordre dans lequel ces étapes se produisent (**Figure 61**) conduisant à une forme unique sous forme d'un complexe NFS1-ISCU dans lequel ISCU contient du fer dans son site d'assemblage et NFS1 un persulfure, qui est l'état initial pour la biosynthèse (**Etat intermédiaire 1**). De plus, l'insertion du fer dans le site d'assemblage d'ISCU avant l'insertion du soufre est une étape conservée à travers les espèces, ce qui indique une forte conservation de ce mécanisme au cours de l'évolution.

Le persulfure de NFS1 est ensuite transféré à ISCU, ce qui conduit à une forme persulfurée d'ISCU sur la cystéine Cys104 (**Figure 60, Etat intermédiaire 2**). Cette réaction est spontanée et unidirectionnelle, ce qui indique que la réaction inverse (transfert de ISCU à NFS1) est inefficace. Enfin FDX2 vient réduire le persulfure d'ISCU en ion sulfure. D'après nos données de titration, cette étape pourrait conduire à une espèce Fe-SH appelée intermédiaire [1Fe1S] (**Figure 60, Etat intermédiaire 3**) et ensuite par dimérisation d'ISCU assistée par NFS1, à un dimère dans lequel deux espèces Fe-SH se condensent pour former un centre [2Fe2S] pontant (**Figure 60, Etat intermédiaire 4**). Ce centre pontant migrerait alors dans une des deux sous-unités du dimère d'ISCU, permettant alors la dissociation du dimère (**Figure 60, Etat intermédiaire 5**). Enfin, le monomère d'ISCU contenant un centre [2Fe2S] se dissocierait de NFS1 par échange avec apo-ISCU ou Fe-ISCU conduisant alors un monomère d'ISCU libre qui serait pris en charge par le système chaperon HSC20/HSPA9. Il n'est également pas exclu que les étapes 1, 2 et 3 ne soit pas totalement synchronisées sur les deux sous-unités du complexe NIAU si les deux sous-unités de NFS1 peuvent fonctionner de manière indépendante jusqu'à formation de l'état **intermédiaire 3**, qui lui serait le seul intermédiaire pouvant conduire à la formation de centre [2Fe2S].

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

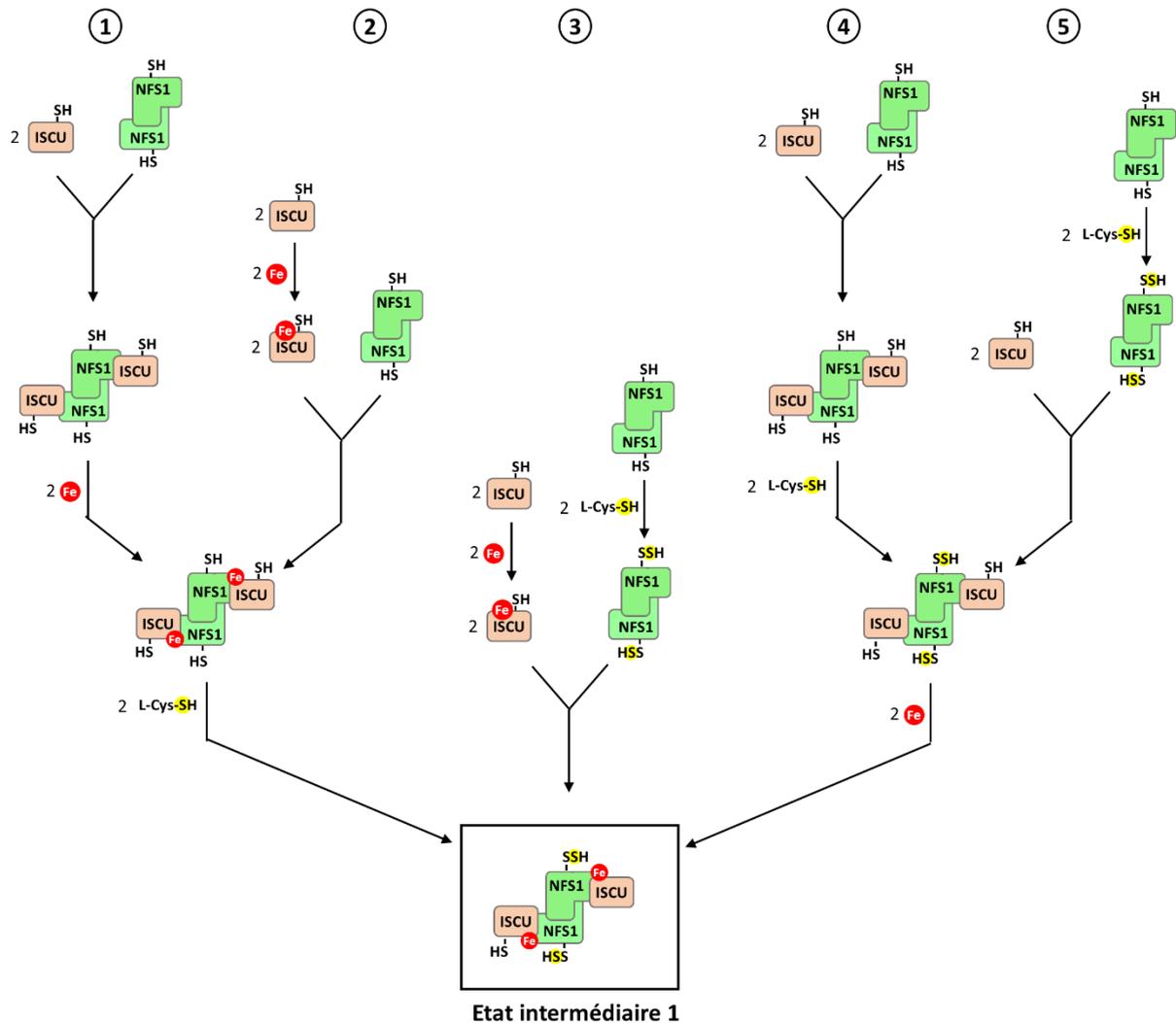


Figure 61 Différentes voies de formation de l'état intermédiaire 1 initiant la formation de l'assemblage des centres Fe-S. (1) Formation du complexe entre apo-ISCU et NFS1 puis insertion du fer dans ISCU suivi par la formation d'un persulfure sur NFS1. (2) Insertion du fer dans ISCU libre puis formation du complexe entre Fe-ISCU et NFS1 suivie par la formation d'un persulfure sur NFS1. (3) Insertion du fer dans ISCU libre et formation d'un persulfure sur NFS1 suivie par la formation d'un complexe entre Fe-ISCU et NFS1 persulfuré. (4) Formation du complexe entre apo-ISCU et NFS1 suivie par la formation d'un persulfure sur NFS1 précédant l'insertion de fer dans ISCU. (5) Formation d'un persulfure sur NFS1 puis formation du complexe entre apo-ISCU et NFS1 persulfuré suivie par l'insertion de fer dans ISCU.

Mécanisme de l'étape de transfert de persulfure et d'accélération par FXN

De manière remarquable, l'étape de transfert de persulfure est métal dépendante et fonctionne en présence de zinc ou de fer. Le métal pourrait être important soit pour structurer le site d'assemblage en positionnant Cys104 et en fixant le persulfure, soit pour activer le persulfure pour permettre la réaction de transpersulfuration, ou bien les deux. Les structures cristallographiques du complexe NIAU ont mis en évidence que la cystéine catalytique Cys381 de NFS1 devient ligand du zinc en remplaçant la

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

cystéine 35 d'ISCU (**Figure 62a-b**). Le métal pourrait donc être impliqué dans le transfert vers Cys104 en liant directement le persulfure. Des données obtenues par spectroscopie UV-visible par Batoul Srour (Postdoc au laboratoire), ont montré que le persulfure porté par la cystéine catalytique Cys381 de NFS1 est initialement déprotoné puis vient se lier au métal dans le complexe avec Zn-ISCU ou Fe-ISCU. Un état totalement déprotoné est effectivement attendu à pH 8,0 en raison du pKa des persulfures (pKa 6.2). Les analyses par spectroscopie Mössbauer et par alkylation en conditions natives, suggèrent également que la liaison du persulfure au métal se fait par échange avec la cystéine 35 d'ISCU, comme dans le cas de la cystéine non-persulfurée. Ces données suggèrent donc que le métal joue un rôle essentiel en fixant le persulfure de NFS1. La réaction de transpersulfuration peut être formellement décrite comme une attaque nucléophile de Cys104 d'ISCU sur le soufre terminal du persulfure de Cys383 de NFS1. Or, le persulfure de Cys381 étant initialement déprotoné, donc nucléophile, il est nécessaire de le rendre électrophile pour permettre la réaction avec Cys104. Sur cette base, nous pouvons proposer un mécanisme dans lequel le métal jouerait le rôle d'un acide de Lewis en fixant le persulfure afin de le rendre électrophile pour faciliter le transfert (**Figure 63**). Cependant, l'étude de la structure du complexe NIAU montre que le persulfure lié à la place de Cys35 serait difficilement accessible à Cys104, en raison de la gêne stérique du métal et de ses ligands Cys61, Asp37 et His103 qui bloquent l'accès (**Figure 62a,b**). Il semblerait donc qu'un réarrangement soit nécessaire pour permettre la réaction de transpersulfuration.

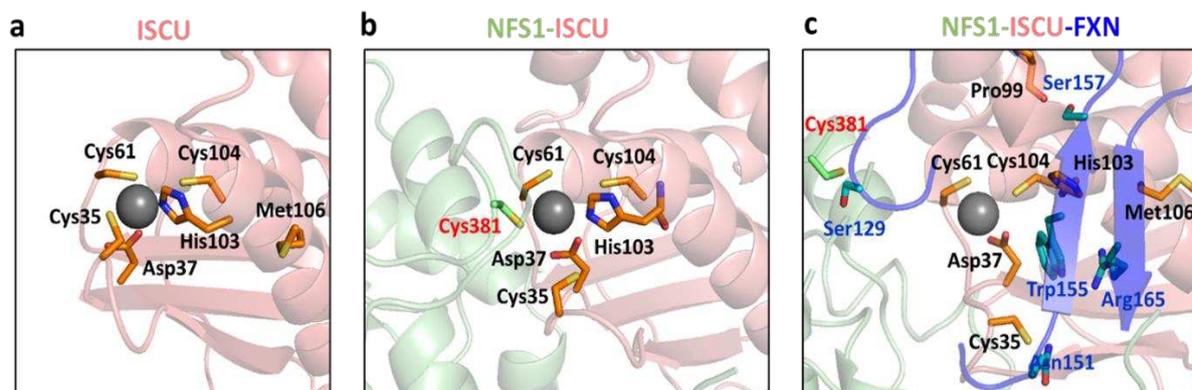


Figure 62 Réarrangement de l'atome de zinc d'ISCU en présence de NFS1 et de la FXN. (a) Structure de Zn-ISCU de *M. musculus* résolue par RMN (code PDB : 1WFZ). L'atome de zinc est initialement coordonné par les résidus Cys35, Asp37, Cys61 et His103. (b) Structure cristallographique du complexe humain NIAU (code PDB : 5WLW). La cystéine catalytique de NFS1 Cys381 devient ligand du zinc et le résidu Cys35 de ISCU est repoussé vers l'extérieur. (c) Structure du complexe humain NIAUF résolue par microscopie électronique (code PDB : 6NZU). Le résidu Asn151 de la FXN permet de garder le résidu Cys35 d'ISCU éloigné du centre métallique. Le résidu Trp155 de la FXN permet de repousser le résidu His103 d'ISCU par une interaction de type π - π permettant de libérer le résidu Cys104 d'ISCU.

La structure résolue par microscopie électronique du complexe NIAUF montre que FXN interagit avec de nombreux acides aminés clés du site métallique via son feuillet β contenant ses résidus

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

les plus conservés. FXN interagit avec la cystéine Cys35 d'ISCU via son asparagine Asn151 ce qui stabilise Cys35 dans une position non liante, cela pourrait stabiliser l'intermédiaire métal-persulfure (**Figure 62c** et **Figure 63**). Une interaction π - π entre le tryptophane Trp155 de FXN et l'histidine His103 d'ISCU permet de stabiliser His103 dans une position non liante libérant ainsi un espace entre le persulfure lié au métal à la place de Cys35 et Cys104 (**Figure 62c** et **Figure 63**). De plus une interaction entre la sérine Ser157 de FXN et la proline Pro99 d'ISCU vient stabiliser l'hélice α portant Cys104 et His103 dans une position qui favorise la dissociation de His103 et le rapprochement de Cys104 vers le métal. L'ensemble de ces interactions pourrait donc favoriser l'attaque nucléophile de Cys104 sur le persulfure lié au métal en réduisant l'encombrement stérique (**Figure 62c**). Nos données montrant que Cys104 se lie au métal dans le mutant H103A vont également dans ce sens. Ainsi, en absence de FXN, des conformations dans lesquelles His103 serait soit ligand, soit non-liante, pourrait être en équilibre et la conformation avec His103 non-liante serait celle permettant le transfert de soufre entre Cys381 et Cys104. FXN viendrait alors stabiliser la conformation favorable au transfert.

Cependant, dans cette structure la boucle flexible de NFS1 est dans une position intermédiaire entre le métal et le PLP où Cys381 est stabilisée par une interaction avec la sérine Ser129 de FXN (**Figure 32c**). Néanmoins, dans cette structure Cys381 n'est pas persulfurée. Il est donc difficile de conclure quant à la pertinence de cette interaction en raison des propriétés acido-basique des persulfures qui sont différentes des cystéines et peuvent donc modifier la nature des interactions électrostatiques avec d'autres chaînes latérales.

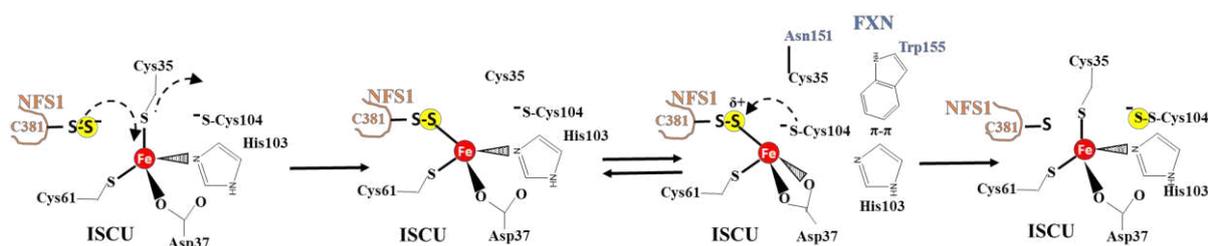


Figure 63 Modèle du transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU. Le persulfure de la cystéine catalytique 381 de NFS1 est apporté par une boucle flexible et devient ligand du métal en s'échangeant avec la cystéine Cys35 d'ISCU. La FXN permet également de garder éloigné la cystéine Cys35 et d'éloigner l'histidine His103 réduisant ainsi l'encombrement stérique permettant à la cystéine Cys104 d'ISCU de réaliser une attaque nucléophile sur le persulfure porté par la cystéine Cys381 de NFS1. Une fois le transfert terminé les ligands initiaux se relient au métal et la boucle flexible portant la cystéine catalytique Cys381 retourne vers le PLP.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Mécanisme de réduction de persulfure par FDX2

De même que pour le transfert de persulfure, nous avons constaté que la réduction de persulfure par le couple FDX2/FXDR est dépendante de la présence du fer. Par contre, cette réaction n'est pas possible en présence de zinc à la place du fer. Comme nous l'avons exposé dans l'introduction (section C.4.3) la réduction de persulfure nécessite l'apport d'électrons, il est donc possible que le fer participe de manière redox, ce qui expliquerait que la réaction soit impossible avec le zinc car celui-ci n'a pas d'activité redox en biologie. En effet, les ions fer dans le centre [2Fe2S] formé à l'issue de la réaction sont tous deux dans l'état +III, ce qui conforte l'idée que le fer joue un rôle redox dans la réduction de persulfure. Sachant que la ferrédoxine est capable de n'apporter qu'un seul électron à la fois, il est possible que le second électron soit apporté par le fer. Au final, ces deux réactions fer-dépendantes permettraient de coordonner à la fois l'apport en soufre et la production d'ions sulfures, avec la présence de fer dans ISCU et ainsi éviter la libération d'ions sulfures et apporter le nombre adéquat de soufre à ISCU. Ces deux mécanismes seraient donc des aspects essentiels menant à la formation d'un centre [2Fe2S].

Formation du centre binucléaire [2Fe2S]

Nos résultats suggèrent que la formation d'un centre binucléaire [2Fe2S] nécessite une dimérisation d'ISCU (**Figure 60, Etat intermédiaire 4**). Les deux structures cristallographiques du complexe NIAU montrent deux conformations différentes. La conformation dite « fermée » où les deux ISCU sont totalement à l'opposée empêchant une dimérisation, et la conformation dite « ouverte » où les deux sites de fixation d'ISCU sont proches laissant imaginer la possibilité d'une dimérisation. Ces deux conformations pourraient être en équilibre en solution, mais cela n'a encore jamais été clairement montré. La dimérisation pourrait se produire soit avant, soit après, la réduction du persulfure d'ISCU par FDX2. Dans le premier cas, un centre inter-domaine Fe(+II)-Fe(+II) se formerait avec des persulfures pontant entre les deux atomes de fer. Cependant, cette hypothèse ne semble pas cohérente avec les données de SAXS montrant que FDX2 se lie de manière spécifique à la conformation « fermée » où les deux ISCU sont éloignées (Boniecki & al, 2017). Dans le deuxième cas, où la dimérisation se produirait après réduction par FDX2, deux précurseurs Fe-S (ou [1Fe1S]) fusionnerait pour former un centre [2Fe2S] inter-domaine qui serait ensuite transféré à un seul monomère d'ISCU. Nous avons également montré que la machinerie ISC eucaryote ne formait uniquement des centres [2Fe2S]. Ces données sont compatibles avec le fait que la formation des centres [4Fe4S] soit réalisée par les protéines ISCA *in vivo*.

Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC eucaryote

Rôle du zinc

Malgré le fait que le zinc empêche la formation de centre Fe-S dans ISCU, la pertinence physiologique du zinc dans ISCU reste ouverte. Plusieurs équipes ont rapporté la présence de zinc dans ISCU (Iannuzzi & al, 2014 ; Ramelot & al, 2004 ; Liu & al, 2005 ; Fox & al, 2019). La présence de zinc n'est peut-être donc pas artéfactuelle mais pourrait avoir un rôle défini *in vivo*. Le zinc pourrait permettre de structurer ISCU en absence de fer et ainsi éviter l'accumulation de la forme déstructurée qui peut s'agréger en une forme inactive. La forme Zn-ISCU est aussi capable de recevoir un persulfure de NFS1 et FXN accélère cette réaction. Zn-ISCU pourrait donc fonctionner comme une sulfurtransférase, notamment pour le transfert de soufre au composé X essentiel à la machinerie CIA cytosolique. Néanmoins, la présence de zinc dans ISCU nécessite un mécanisme afin d'insérer un atome de fer. Le zinc ayant une meilleure affinité que le fer pour ISCU, l'action d'une métallochaperone serait requise afin de retirer l'atome de zinc pour laisser rentrer le fer. Nous avons vu dans **l'article #2** que la frataxine n'est pas capable d'échanger le zinc par du fer. Cependant, la chaperonne HSPA9 et sa co-chaperonne HSC20 qui catalyse le transfert du centre [2Fe2S] d'ISCU vers des accepteurs est un candidat potentiel dans l'échange de zinc par du fer au sein d'ISCU (Puglisi & Pastore, 2018). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la co-chaperonne HSC20 lie de manière spécifique du zinc au sein d'un motif CX₂C-CX₂C qui est essentiel pour l'interaction avec ses partenaires (Bitto & al, 2008 ; Kim & al, 2018). Ce système chaperon HSPA9/HSC20 pourrait potentiellement échanger l'atome de zinc par un atome de fer dans ISCU.

Chapitre 5 Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

1. Contexte de l'étude

Durant les deux dernières décennies, l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC d'*E. coli* a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, la plupart des reconstitutions de cette machinerie ont été menées avec du DTT à la place du réducteur naturel, la ferrédoxine Fdx et sa réductase FdxR. Les seules études menées sur la ferrédoxine Fdx avaient montré qu'elle interagit avec IscS et un rôle de réductase du persulfure porté par IscS avait été avancé. Donc un mécanisme différent de celui de réduction de l'espèce persulfure-fer dans ISCU par FDX2 que nous avons trouvé pour la machinerie ISC de souris. Nous avons donc entrepris une étude du mécanisme d'assemblage avec la machinerie complète. Nous avons pour cela réalisé des études similaires à celles menées avec la machinerie ISC de *M. musculus* avec le test de détection des persulfures (ARBS), des approches cinétiques et des études structurales par spectroscopies CD, RPE et Mössbauer et par spectrométrie de masse. Nous allons voir que l'étude de cette machinerie nous a permis d'isoler et de caractériser des intermédiaires de la réaction que nous n'avions pas pu isoler avec la machinerie ISC murine.

2. Reconstitution de la machinerie ISC d'*E. coli*

2.1 Mesure de zinc dans IscU

Nous avons dans un premier temps mesuré la quantité de zinc dans la protéine IscU d'*E. coli* purifiée. Nous avons détecté entre 0,5 et 0,7 atome de zinc par IscU. Comme nous l'avons vu précédemment avec la machinerie eucaryote, le zinc étant susceptible d'empêcher l'insertion du fer et donc la formation de centres Fe-S, la protéine a été préalablement démétallée avec du DTPA puis repurifiée par chromatographie d'exclusion de taille. Le profil d'élution montre la présence majoritaire de monomère et une forme minoritaire oligomérique (**article #3, Figure 1a**). Nous avons montré au chapitre 4, que seule la forme monomère d'ISCU de *M. musculus* était totalement active, nous avons donc travaillé uniquement sur la forme monomérique d'IscU d'*E. coli*. Par ailleurs, les mesures de zinc ont montré que la protéine est dépourvue de zinc après cette étape.

2.2 Réaction d'assemblage

Nous avons réalisé des assemblages de centres Fe-S en utilisant toutes les protéines de la machinerie ISC d'*E. coli* comprenant IscU, IscS la cystéine désulfurase et le couple Fdx/FdxR. Les réactions d'assemblage ont été réalisées en incubant 100 μM d'apo-IscU avec 100 μM de Fe^{2+} , 200 μM de NADPH, 10 μM d'IscS, Fdx et FdxR puis en ajoutant la L-cystéine (100 μM) pour initier la réaction.

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

Le spectre UV-visible du produit de la réaction montre des absorbances à 330, 456 et 510 nm caractéristiques d'un centre [2Fe2S] et qui est très similaire au spectre obtenu avec la protéine ISCU eucaryote (**Figure 64a**). La cinétique d'assemblage suivie à 456 nm montre une progression linéaire avant d'atteindre un plateau lorsque toute la L-cystéine est consommée (**Figure 64b**). L'allure de la courbe est similaire à celle obtenue pour la machinerie souris, ce qui nous a amené à utiliser le même modèle cinétique que celui utilisé dans l'**article#2**. Le plateau est atteint après environ 5 minutes de réaction dans ces conditions. La vitesse globale de formation de centres Fe-S mesurée par régression linéaire est de l'ordre de $1,9 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ ce qui est très proche de la vitesse mesurée pour la machinerie de *M. musculus* en présence de FXN qui est de l'ordre de $2,3 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$.

En absence du couple Fdx/FdxR, des centres Fe-S sont également formés, mais la réaction est beaucoup plus lente. Nous avons mis en évidence avec la machinerie eucaryote qu'en absence de FDX2/FDXR, la L-cystéine réduit le persulfure de NFS1 libérant ainsi du soufre qui vient former de manière non spécifique des centres Fe-S. Dans ces conditions, la réaction cinétiquement limitante est la réduction du persulfure en sulfure qui est dépendante de la concentration en L-cystéine, tandis que la réaction FDX2 est indépendante de la concentration en L-cystéine. Nous avons donc testé l'effet de la concentration en L-cystéine sur la vitesse d'assemblage par le système ISC d'*E. coli*. L'analyse des cinétiques montre que la réaction est dépendante de la concentration en L-cystéine en absence de Fdx/FdxR, mais indépendante de celle-ci en sa présence (**Figure 64c,d**). De plus, l'allure de la courbe des cinétiques en absence de Fdx/FdxR est une sigmoïde caractéristique d'une réaction successive, tandis que la cinétique en présence de Fdx/FdxR est linéaire jusqu'à atteindre un plateau. La dépendance en L-cystéine et l'allure sigmoïdale indiquent donc qu'en absence de Fdx/FdxR, le mécanisme de réaction est celui décrit pour la réaction thiol-dépendante.

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

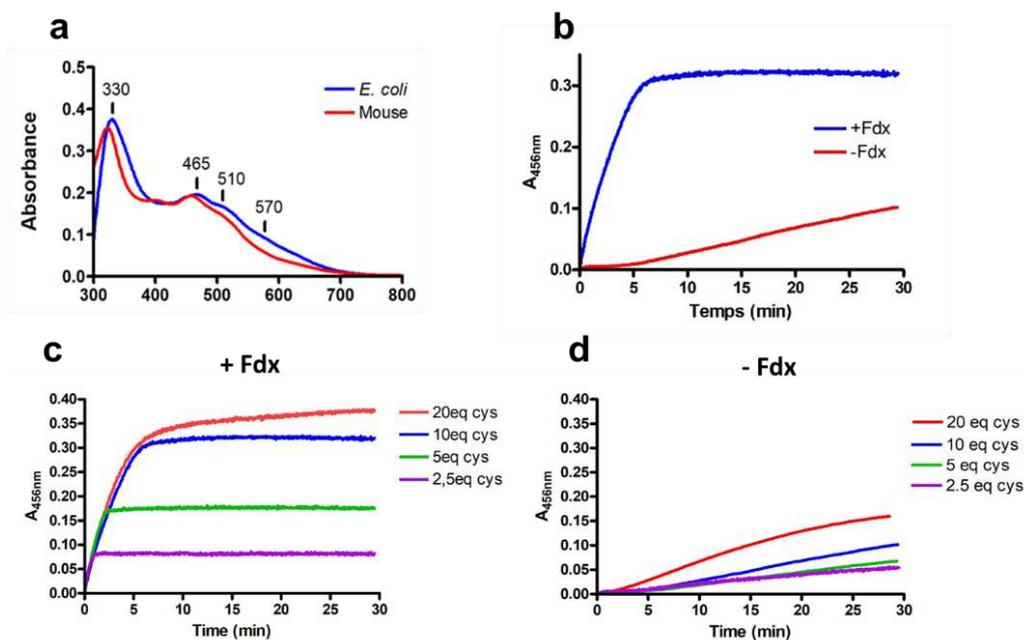


Figure 64 Reconstitution de centres Fe-S par la machinerie ISC d'*E.coli*. (a) Spectre UV-visible après une cinétique d'assemblage en conditions catalytiques de la machinerie ISC d'*E.coli* (spectre bleu). Le spectre rouge correspond au spectre obtenu lors d'une reconstitution en conditions catalytiques avec la machinerie ISC de *M. musculus*. (b) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec Fe-IsclU en présence ou absence de Fdx. (c-d) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec Fe-IsclU en faisant varier la quantité de L-cystéine (entre 2,5 et 20 équivalents comparé au complexe IsclS-IsclU) en présence (c) ou absence (d) de Fdx.

Ces données montrent donc que le mécanisme d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC complète est Fdx-dépendant. Nous avons donc cherché à élucider le mécanisme de la réaction Fdx-dépendante, par une analyse étape par étape du processus d'assemblage.

3. Insertion et titration du fer dans la protéine échafaudage IsclU

L'un des aspects essentiels du mécanisme d'assemblage est la localisation du site de fixation du fer dans IsclU et la quantité d'atomes de fer capables de se lier dans ce site. Nous avons vu dans l'article #3 qu'apo-IsclU lie du fer dans son site d'assemblage. Nous avons donc cherché à déterminer combien d'atomes de fer pouvaient se lier dans ce site. La titration en fer par CD montre que le signal maximum est atteint avec 1 équivalent de Fe^{2+} par IsclU, ce qui indique qu'un seul atome de fer se lie dans ce site (Figure 65a). Lorsque la protéine IsclU reconstituée avec du Fe^{2+} est exposée à l'oxygène de l'air, le signal CD disparaît instantanément. Aucune signature CD correspondant à du Fe^{3+} lié à des cystéines et des histidines n'est observée (absorption attendue dans le domaine du visible entre 300 et 500 nm) (McLaughlin & al, 2012 ; Tucker & al, 2008). Il semble donc que le fer dans le site d'assemblage soit oxydé par l'oxygène, mais que le Fe^{3+} ne soit pas stable dans le site d'assemblage.

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

Nous avons également étudié l'insertion du fer au sein d'IscU par spectroscopie Mössbauer. Pour cela, la protéine apo-IscU a été incubée avec 1 équivalent de $^{57}\text{Fe}^{2+}$. Au cours de la préparation des échantillons Mössbauer pour lesquels la protéine apo-IscU est concentrée à 2 mM, nous avons observé de manière récurrente la formation de précipité au moment de l'ajout du fer. Nous avons tenté différentes méthodes d'ajout du fer, soit en le diluant dans le tampon avant ajout d'IscU afin d'éviter un choc de concentration locale, soit en l'ajoutant goutte à goutte après ajout d'IscU, mais la formation de précipité est présente quelle que soit la méthode utilisée. Le spectre Mössbauer montre la présence de deux espèces (**Figure 65b**). La première espèce possède des paramètres identiques au centre à fer dans le site d'assemblage d'ISCU de *M. musculus*. La seconde espèce qui représente 43 % du signal présente un déplacement isomérique $\delta = 1,23 \text{ mm.s}^{-1}$ qui est compatible avec du fer lié par des azotes et des oxygènes. La largeur de raie est de $0,84 \text{ mm.s}^{-1}$, ce qui suggère qu'il s'agit de fer dans un état peu structuré pouvant correspondre à du fer libre dans le tampon ou fixé de manière non-spécifique à la protéine. La présence de cette espèce est probablement liée à la précipitation de la protéine. Il semble donc que le fer dans le site d'assemblage d'IscU d'*E. coli* adopte une structure (nature et nombre des ligands, géométrie) identique à celle du centre à fer d'ISCU de souris.

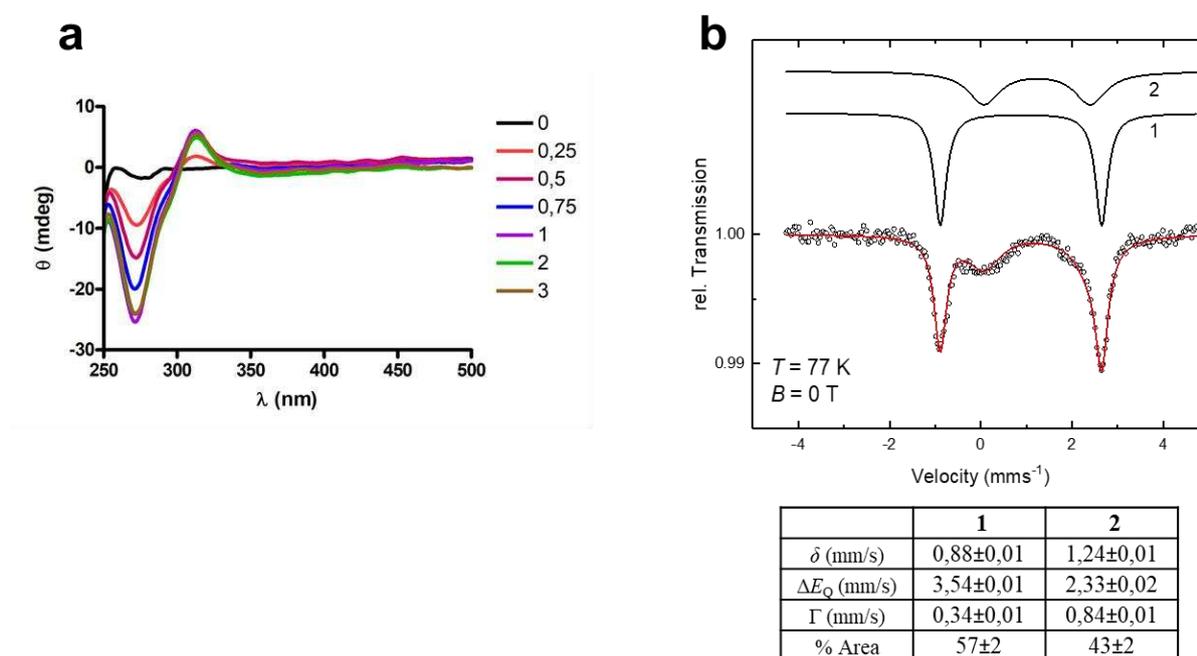


Figure 65 Caractérisation de la forme Fe-IscU. (a) Titration d'apo-IscU avec une quantité croissante en Fe^{2+} suivie par CD. (b) Spectre Mössbauer d'apo-IscU incubée avec 1 équivalent de Fe^{2+} enrichie en ^{57}Fe . Les paramètres des composantes sont donnés dans le tableau.

4. Etude de la réaction de transpersulfuration entre IscS et IscU

Nous avons utilisé la méthode d'alkylation ARBS afin d'étudier le processus de transpersulfuration entre IscS et IscU. Ces deux protéines possédant chacune 3 résidus cystéines, dans leur état non-persulfuré, leurs 3 résidus cystéines seront alkylés et en présence d'un persulfure seulement deux résidus cystéines apparaîtront alkylés.

Nous avons dans un premier temps étudié la formation du persulfure sur IscS. Lorsque IscS est incubée avec de la L-cystéine, l'espèce correspondant à la forme non persulfurée (IscS +3) est convertie à 95 % en une espèce ayant perdu une unité d'alkylation (IscS +2) (**Figure 66a**). On constate également l'absence d'autres bandes en dessous de la bande IscS +2, ce qui indique qu'une seule cystéine est persulfurée.

Nous avons ensuite analysé le transfert du persulfure d'IscS vers Fe-IscU en incubant ces deux protéines en présence de L-cystéine (**Figure 66b**). L'espèce correspondant à la forme non persulfurée de IscU (IscU +3) est principalement convertie en une espèce ayant perdu une unité d'alkylation (IscU +2) (**Figure 66b, en condition réductrice**). 2 espèces minoritaires ayant perdu 2 (IscU +1) et 3 (IscU +0) unités d'alkylation sont également détectées. Pour déterminer la nature de ces espèces (persulfurée ou autres modifications) nous avons analysé la réaction de transfert dans des conditions non réductrices qui permettent de distinguer la présence d'un persulfure d'une autre modification sur un résidu cystéine : ponts disulfures, acide sulfénique, sulfonique ... (**voir article #1**). Dans des conditions non réductrices, l'espèce IscU +2 disparaît au profit de l'espèce IscU +3, tandis que les espèces IscU +1 et IscU +0 sont toujours visibles (**Figure 66b, en condition non réductrice**). Cette analyse confirme que l'espèce IscU +2 est bien un persulfure tandis que les espèces IscU +1 et IscU +0 sont d'autres types de formes oxydées. Nos conditions étant anaérobiques, il n'y a pas ou quasiment pas d'oxygène (< 2 ppm), ce qui rend la formation d'acide sulfénique, sulfonique, sulfonique théoriquement impossible. Il est donc très probable que ces formes d'oxydations soient des ponts disulfures intramoléculaires ou des sulfénamides. L'espèce IscU +1 semble migrer légèrement plus vite en conditions non réductrices que réductrices, suggérant plutôt la présence d'un pont disulfure intramoléculaire. L'espèce IscU +0 semble toujours présente mais sous forme de deux espèces migrant différemment. Cela suggère qu'il s'agit d'un mélange de formes oxydées de plusieurs types, mais l'intensité des bandes est trop faible pour définitivement conclure quant à leur nature (pont disulfure ou sulfénamide). Au final, l'espèce majoritaire correspond donc à une forme d'IscU persulfurée sur une seule de ses cystéines avec formation de manière minoritaire de pont disulfure intramoléculaire ou de sulfénamide. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus préalablement avec IscU de *A. vinelandii* où jusqu'à 6 atomes de soufres ont été retrouvés sur différents résidus cystéines d'IscU sous la forme de persulfures et/ou de polysulfures (Smith & al, 2005). Cependant, dans cette étude les auteurs ont incubé 100 µM de complexe IscU-IscS en présence de 20 équivalents de L-cystéine (2 mM) durant 20 minutes. Il est fort probable que la L-cystéine en

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

excès ait réduit le persulfure d'IscS générant ainsi de la L-cystéine persulfurée capable de réagir de manière non spécifique avec les résidus cystéines d'IscU. De plus la présence de zinc n'avait pas été contrôlée dans ces études. Nos données, dans des conditions contrôlées avec une forme homogène d'IscU ne contenant qu'un seul fer et des concentrations de L-cystéine équimolaires, montrent qu'un seul persulfure est transféré.

De plus, en absence de fer le persulfure d'IscS n'est pas transféré à IscU (**Figure 66c, 1^{er} puit**), ce qui indique, comme pour la machinerie eucaryote, que le transfert de persulfure est un processus métal dépendant.

Au cours de ma thèse, une étude sur le système bactérien d'*E. coli* a été publiée par le groupe de David Barondeau (Lin & al, 2020). Dans cet article, les auteurs ont observé par spectrométrie de masse native, qu'en présence de 5,5 équivalents de fer, apo-IscU reçoit jusqu'à deux sulfures sous forme persulfure ou polysulfure. Bien que la proportion d'IscU doublement persulfurée soit très faible (environ 10%), nous avons testé cette hypothèse en incubant le complexe IscS-IscU en présence de deux équivalents de Fe^{2+} et de L-cystéine. Dans ces conditions, un seul persulfure est transféré sur IscU et ce malgré la présence d'un second persulfure sur IscS (**Figure 66c, 2^{ème} et 3^{ème} puit**). Ce résultat est cohérent avec l'insertion d'un seul atome de fer dans IscU dans nos conditions. Il semblerait donc que les résultats rapportés par le groupe de D. Barondeau correspondent à un artefact, lié à l'excès de fer (5,5 équivalents) et de L-cystéine (4 équivalents). Nous pouvons donc en conclure qu'IscU reçoit un seul et unique persulfure.

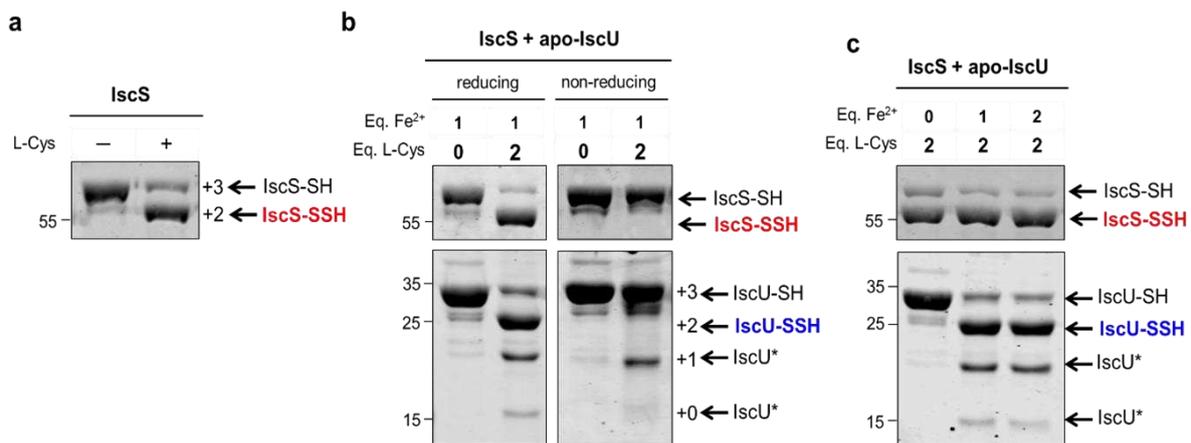


Figure 66 Persulfidation d'IscS et transfert du persulfure vers IscU. (a) Persulfidation d'IscS suivie par la méthode ARBS en présence ou absence de 1 équivalent de L-cystéine. Les échantillons sont chargés sur gel SDS-PAGE 10 %. (b) Persulfidation d'IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et d'ions Fe^{2+} et de 1 ou 2 équivalents de L-cystéine. Les échantillons de ces alkylations supplémentés ou non par du β -mercaptoéthanol sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % et 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU. (c) Persulfidation d'IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS, 0, 1 ou 2 équivalents d'ions Fe^{2+} et de 2 équivalents de L-cystéine. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % et 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU.

5. Effet de Fdx sur le persulfure d'IscU

Nous avons ensuite évalué l'effet du couple Fdx/FdxR sur le persulfure d'IscU. Le complexe IscS-IscU a été incubé avec un et deux équivalents de L-cystéine durant 10 minutes puis un équivalent de Fdx/FdxR en présence de NADPH a été ajouté et la réaction a été analysée après 10 minutes de réaction par le test ARBS. Le profil d'alkylation révèle que le persulfure d'IscU disparaît quasi totalement en présence de Fdx/FdxR, ce qui indique donc qu'il a été réduit par la Fdx (**Figure 67, 4^{ème} et 5^{ème} puit**). Il est important de noter que les espèces minoritaires IscU +1 et IscU +0 ne sont pas réduites par le complexe Fdx/FdxR ce qui renforce notre interprétation que ce ne sont pas des persulfures et non plus des espèces impliquées dans l'assemblage des centres Fe-S. Nous avons vu que IscU ne pouvait pas accumuler deux persulfures en même temps, nous nous sommes donc posé la question de savoir si la réduction du premier persulfure permettrait le transfert d'un second persulfure. Lorsque le complexe IscS-IscU a été incubé avec deux équivalents de L-cystéine puis 1 équivalent de Fdx/FdxR, le persulfure sur IscU est réduit et un persulfure est toujours présent sur IscS. Donc, malgré la réduction du premier persulfure, un deuxième persulfure ne peut pas être transféré à IscU, même en présence de deux équivalents de Fe²⁺. Ces résultats indiquent également que le couple Fdx/FdxR n'est pas capable de réduire le persulfure d'IscS comme cela avait été proposé par d'autres équipes.

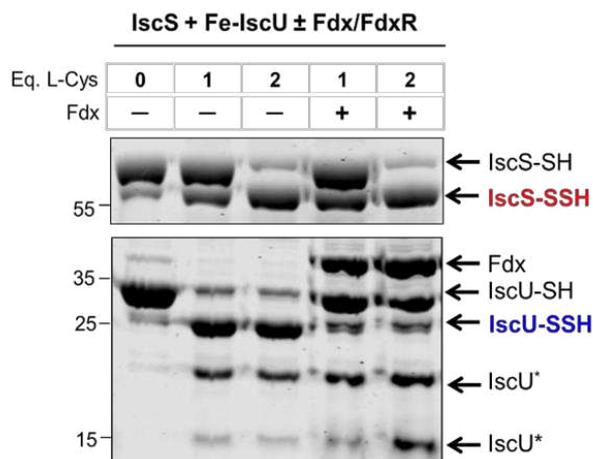


Figure 67 Réduction du persulfure d'IscU par Fdx. La réduction du persulfure d'IscU est suivie par la méthode ARBS. Fe-IscU est premièrement persulfuré en présence de 1 équivalent d'IscS en présence de 1 ou 2 équivalent de L-cystéine durant 10 minutes. L'étape de réduction est initiée lorsque 1 équivalent de Fdx/FdxR est ajouté au mélange réactionnel durant 10 minutes. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % ou 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU.

6. Mécanisme de formation du centre [2Fe2S]

Nous avons montré jusqu'ici que le monomère d'IscU ne pouvait lier qu'un seul atome de fer et qu'un seul persulfure était transféré et réduit. Sachant que le produit final est un centre [2Fe2S], nous

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

avons émis l'hypothèse, comme dans le cas de la machinerie eucaryote, qu'il faille une dimérisation entre deux monomères d'IscU afin de former le centre binucléaire [2Fe2S]. Cela impliquerait la formation d'un précurseur de type [1Fe1S] à l'issue de la réduction par Fdx.

6.1 Recherche d'un intermédiaire [1Fe1S]

Nous avons constaté que lorsque l'on réalise une réaction d'assemblage en incubant les protéines IscS, IscU, Fdx et FdxR en quantité stœchiométrique, en présence d'un équivalent de Fe²⁺ et de L-cystéine et avec deux équivalents de NADPH, aucun centre Fe-S ne se forme (**Figure 68a**), alors que dans le système souris, dans les mêmes conditions, un centre [2Fe2S] est formé. Pourtant, l'analyse par le test ARBS montre bien que le persulfure d'IscU est réduit. Cependant, en ajoutant deux équivalents de Fe-IscU à l'issue de cette réaction, nous avons constaté la formation de centres Fe-S très rapides (**Figure 68b, courbe bleue**). La réaction est très efficace avec près de 93 % du fer et de la L-cystéine initiales incorporés sous forme de centre [2Fe2S]. Ces résultats, suggèrent qu'il est possible d'isoler un intermédiaire dans lequel le persulfure a été réduit en ion sulfure mais qui n'est pas encore un centre [2Fe2S], il pourrait donc s'agir d'un intermédiaire [1Fe1S].

Afin de déterminer si la formation de centres Fe-S est spécifique à l'ajout de Fe-IscU, nous avons réalisé la même expérience en ajoutant 2 équivalents de Zn-IscU (**Figure 68b, courbe rouge**). Aucune formation de centres Fe-S n'est observée, ce qui indique que soit l'intermédiaire IscU-[1Fe1S] ne se dissocie pas, soit qu'il se dissocie mais dimérise avec le Zn-IscU libre formant un complexe hétérodimérique qui inhibe la formation de centres [2Fe2S].

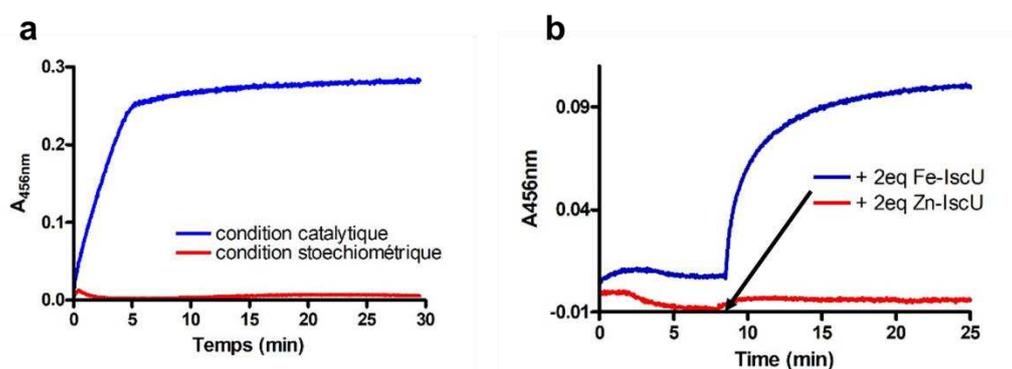


Figure 68 Mécanisme de formation d'un centre [2Fe2S]. (a) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques (courbe bleue) ou stœchiométriques (courbe rouge) suivies à 456 nm avec Fe-IscU en présence de Fdx. **(b)** Cinétiques d'assemblage en conditions stœchiométriques suivies à 456 nm avec Fe-IscU. À 8 minutes de réaction, 2 équivalents de Fe-IscU (courbe bleue), ou 2 équivalents de Zn-IscU (courbe rouge) sont ajoutés au mélange réactionnel.

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

Afin d'obtenir des informations sur la nature de cette espèce intermédiaire, nous avons analysé le mélange réactionnel après réduction par Fdx et avant ajout de Fe-IscU par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). L'analyse par RPE de l'espèce Fe-IscU de départ montre un signal à $g = 14,9$ en mode parallèle, très similaire à celui observé avec ISCU *Mm* qui est caractéristique d'un centre Fe(II) haut-spin ($S = 2$) (**Figure 69a, spectre bleu**). Le spectre RPE du complexe IscS-Fe-IscU après transfert de persulfure à IscU et avant réduction par Fdx, montre des signaux faibles avec plusieurs valeurs de g entre 4 et 9 que nous ne sommes pas encore parvenus à analyser (**Figure 69a, spectre rouge**). Cependant, l'analyse du complexe après réduction par Fdx, montre la présence d'un nouveau signal, à $g = 19$, caractéristique d'un centre Fe(II) haut-spin ($S = 2$) (**Figure 69c, spectre vert**). La différence de valeur de g avant et après réduction par Fdx, indique que la structure électronique du centre à fer a été fortement modifiée après réduction. Ce résultat semble compatible avec la présence d'une espèce Fe(II)-SH, que nous avons désigné précurseur [1Fe1S]. Il existe de très rares exemples d'espèces Fe-SH non-hème mononucléaire dans la littérature. Nous avons en fait trouvé seulement deux complexes inorganiques de ce type, l'un Fe(II) et l'autre Fe(III). Il s'agit du complexe $[(L_5^2a)Fe^{II}(SH)]^+$ où le centre Fe(II) est coordonné dans une géométrie octaédrique par des azotes provenant d'amines et de pyridines (Galardon & al, 2012), et le complexe $[(H_3buea)Fe^{III}(S)]^{2-}$ où le centre Fe(III) est coordonné dans une géométrie bipyramide trigonale par des azotes d'amines et d'amides (Larsen & al, 2004). Le complexe $[(L_5^2a)Fe^{II}(SH)]^+$ constitue donc l'unique modèle disponible pour l'espèce Fe(II)-SH hypothétique dans IscU. Aucun spectre RPE du complexe $[(L_5^2a)Fe^{II}(SH)]^+$ n'a été rapporté mais son spectre UV-visible montre une absorption intense dans le domaine UV vers 280 nm ($8000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et moins intense à 400 nm ($1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) attribuées à des transferts de charge ligand \rightarrow métal. Nos tentatives pour obtenir un spectre UV-visible de l'espèce Fe(II)-SH dans IscU par spectre de différence entre l'état final et initial, se sont révélées infructueuses en raison de la présence du NADPH qui absorbe fortement dans la région d'intérêt, entre 300 nm et 400 nm, et dont la soustraction est difficile car il est partiellement consommé au cours des réactions d'assemblage.

L'analyse RPE de l'intermédiaire [1Fe1S] montre que le fer est dans un état d'oxydation +II après réduction par Fdx alors que les ions fer dans le centre [2Fe2S] sont à l'état d'oxydation +III. Ceci ne semble donc pas cohérent avec l'hypothèse que nous avons proposée pour le système eucaryote où le centre Fe(II) donnerait un des deux électrons pour réduire le persulfure, et FDX2 le deuxième, ce qui conduirait à un intermédiaire Fe(III)-SH. Une autre hypothèse serait donc que Fdx donne successivement deux électrons. Nous avons donc réalisé des expériences avec une quantité limitante en NADPH afin d'empêcher la seconde réduction et ainsi isoler une espèce Fe(III)-SH. Une molécule de NADPH procurant 2 électrons qui sont transmis à FdxR puis au centre [2Fe2S] de Fdx, nous avons réalisé des réactions d'assemblage avec 0,5 équivalent de NADPH. Dans ces conditions, la vitesse d'assemblage est réduite mais la quantité de centres Fe-S formés est équivalente à celle obtenue avec 1 équivalent de NADPH (**Figure 69b**). Cependant, l'analyse par RPE en mode parallèle montre à nouveau

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

la formation de l'espèce à $g = 19$ et dans les mêmes proportions qu'avec 2 équivalents de NADPH (**Figure 69a, spectre violet**). De plus, l'analyse en mode perpendiculaire qui permet de détecter le signal de Fdx réduite (centre $[2Fe_2S]^{1+}$, $S = 1/2$) autour de $g = 2$, montre qu'avec 0,5 équivalent de NADPH la quasi-totalité de Fdx réduite est consommée, ce qui confirme que Fdx est impliquée dans la formation de l'espèce à $g = 19$ (Figure non montrée, en cours de préparation). Ces résultats suggèrent donc que si l'espèce Fe(III)-SH se forme elle n'est pas stable et qu'elle est réduite en Fe(II)-SH. La nature du réducteur est encore inconnue, mais il pourrait s'agir de la L-cystéine qui avait été ajoutée en excès par rapport à IscS, IscU et FDX dans les échantillons RPE. Par contre dans les conditions non limitantes en NADPH, c'est-à-dire avec 2 équivalents de NADPH, le réducteur est probablement Fdx. Ces résultats suggèrent donc que le produit de la réduction par Fdx est une espèce Fe(II)-SH qui doit ensuite dimériser pour pouvoir former un centre $[2Fe_2S]$. Nous avons donc tenté de détecter la formation de dimère au cours de la réaction d'assemblage. Nous discuterons plus en détail dans la partie discussion l'effet ralentisseur observé avec 0,5 équivalent NADPH.

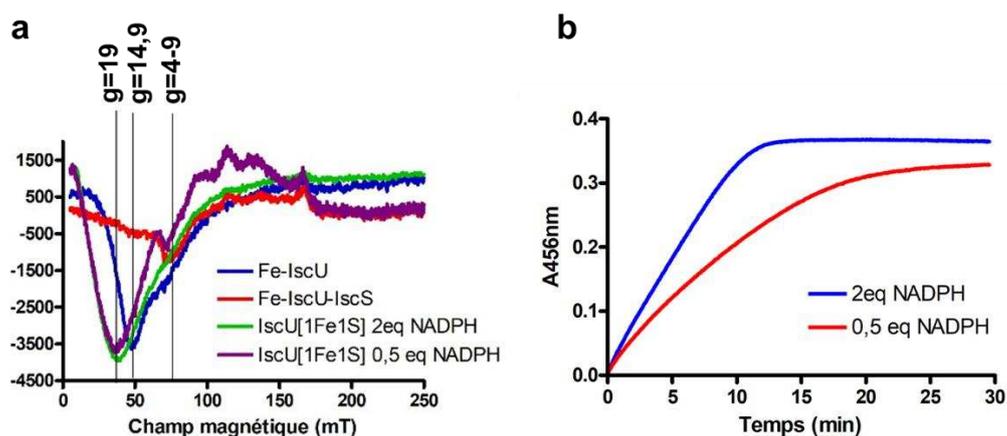


Figure 69 Mécanisme de formation d'un centre $[2Fe_2S]$. (a) Spectres RPE de Fe-IscU seul (spectre bleu), de Fe-IscU-IscS (spectre rouge) ou de l'intermédiaire Fe(II)S-IscU obtenu avec 2 ou 0,5 équivalents de NADPH en conditions stœchiométriques (spectre vert et violet respectivement). Les spectres RPE ont été obtenus en mode parallèle enregistrés en bandes X à une fréquence de microonde de 9,4 GHz, à 7K (sous hélium liquide), avec une puissance de microonde de 10 mW avec une modulation de 10G. (b) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec Fe-IscU en présence de Fdx supplémenté par 0,5 (courbe rouge) ou 2 (courbe bleu) équivalents de NADPH.

6.2 Études par réticulation protéique

Afin de mettre en évidence la formation d'un dimère lors de l'assemblage des centres $[2Fe_2S]$ nous avons réalisé des expériences de réticulation protéique (crosslink). La réticulation est un processus de jonction chimique entre différentes protéines par le biais de liaisons covalentes. Nous avons utilisé différents agents homo-bifonctionnels permettant une réticulation amine vers amine entre les

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

groupements amines primaires en N-terminal et avec la chaîne latérale des lysines. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'agent BS3 qui contient un ester N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) très réactif avec les amines primaires ($-NH_2$) pour former une liaison amide stable. Nous avons réalisé des cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques et stœchiométriques afin de caractériser un dimère d'IscU transitoire au cours de la réaction. En absence de l'agent BS3, en conditions catalytiques et stœchiométriques aucune bande correspondant à un dimère d'IscU n'est observée (**Figure 70, puit T**). En conditions catalytiques une bande apparaît entre 35 kDa et 40 kDa pouvant correspondre à un dimère d'IscU (**Figure 70, gel de gauche**). Cependant cette espèce est également présente avant l'injection de L-cystéine et perdure au cours de la réaction, ce qui ne nous permet pas de dire si un dimère transitoire avec un centre $[2Fe_2S]$ s'est formé. La présence d'une espèce dimérique pontée par l'agent BS3 suggère tout de même que la protéine IscU est capable de dimériser, ce qui avait déjà été observé dans d'autres études. En conditions stœchiométriques le complexe est incubé durant 8 minutes avec de la L-cystéine, puis un mélange contenant le couple Fdx/FdxR et du NADPH est ajouté. Il est également nécessaire d'ajouter de la protéine Fe-IscU en excès à l'issue de cette réaction pour voir se former un centre Fe-S. Nous avons donc ajouté 2 équivalents de Fe-IscU avant l'agent BS3. Une bande similaire apparaît mais uniquement lorsque 2 équivalents de Fe-IscU est ajouté (**Figure 70, gel de droite**). Cette espèce semble être transitoire, mais l'incertitude reste importante et ne nous a pas permis de conclure. Nous nous sommes donc orienté vers la spectrométrie de masse native pour tenter de détecter un dimère transitoire.

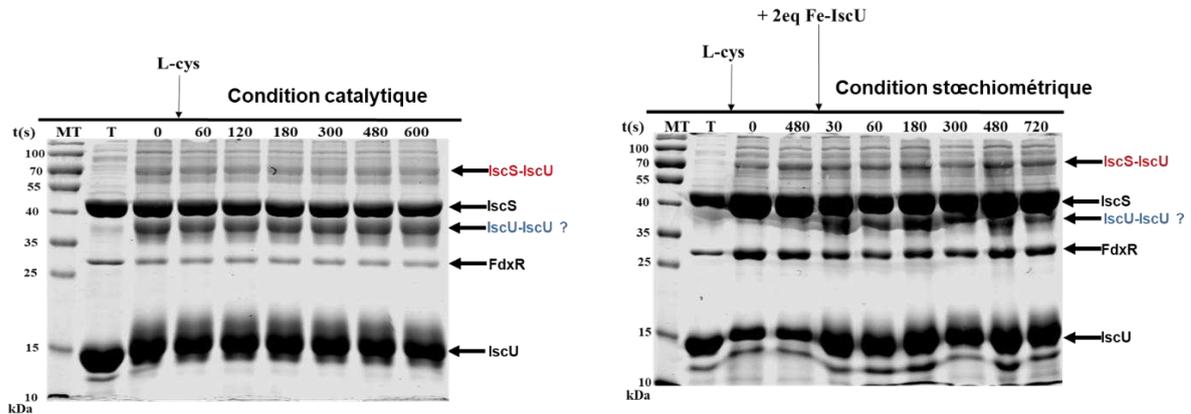


Figure 70 Étude par réticulation protéique afin de mettre en évidence une dimérisation d'ISCU. Des cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques ou stœchiométriques ont été réalisées puis incubées à différents temps avec l'agent réticulant BS3. Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12 %. Le gel correspondant à la cinétique en conditions catalytiques est à gauche, et le gel correspondant à la cinétique en conditions stœchiométriques est à droite.

6.3 Étude par spectrométrie de masse native

Avant de réaliser ces expériences, nous avons regardé si le centre [2Fe2S] dans IscU était résistant à l'oxygène, car les expériences de spectrométrie de masse (MS) sont réalisées en conditions aérobies. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique en conditions catalytiques durant 30 minutes puis nous avons exposé le produit final à l'oxygène (**Figure 71**). Nous pouvons observer que le centre [2Fe2S] est résistant à l'oxygène durant environ 10 minutes puis se dégrade progressivement pendant 30 minutes. Le temps requis pour injecter et analyser les échantillons étant de quelques secondes, la stabilité du centre [2Fe2S] semble suffisante pour espérer détecter ces espèces par MS native.

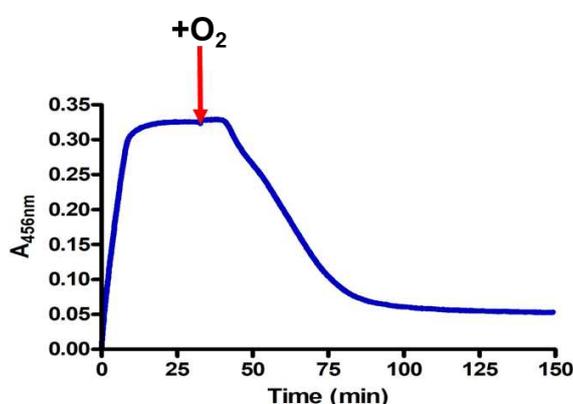


Figure 71 Résistance du centre binucléaire [2Fe2S]. Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec Fe-IscU en présence de Fdx. Le produit final est ensuite exposé à l'oxygène de l'air.

Pour réaliser les analyses par MS native, nous avons réalisé une réaction d'assemblage en conditions catalytiques avec 200 μM d'IscU incubée avec 200 μM de Fe^{2+} , 5 μM d'IscS, Fdx et FdxR, 400 μM de NADPH et 200 μM de L-cystéine pour initier la réaction. L'assemblage a été réalisé à 20°C permettant ainsi de ralentir la réaction qui se termine au bout de 50 minutes facilitant ainsi la détection d'un intermédiaire au cours de la réaction (**Figure 72a**). Des échantillons ont été prélevés à différents temps et le tampon a été échangé sur une colonne Biospin par un tampon acétate d'ammonium compatible avec la spectrométrie de masse native. Cette étape permet également de dessaler les échantillons.

Les spectres de masse native avant l'ajout de L-cystéine montrent au moins trois types d'espèces (**Figure 72b**). Deux massifs correspondant à des formes monomériques d'apo-IscU sont détectés : l'un dans la région 500 – 2000 m/z et l'autre dans la région 2000 - 2500 m/z. Le premier massif correspond à un monomère portant un plus grand nombre de charges que le second, ce qui indique qu'il s'agit d'une forme déstructurée de la protéine. Il pourrait s'agir des formes D et S d'IscU. Des pics très minoritaires

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

pouvant correspondant à un monomère d'IscU avec un atome de fer sont également présents. La présence majoritaire de formes apo protéines est probablement due soit à la perte du fer au cours de l'étape de dessalage, le fer étant très labile, soit à la réactivité avec l'oxygène au moment de l'injection, qui conduit à l'oxydation du fer et à sa dissociation d'IscU. Dans la région 2600 - 3500 m/z, une forme dimérique est détectée qui est elle aussi sous forme apo. Ces derniers résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par réticulation protéique. Après ajout de L-cystéine, les spectres montrent que les deux formes monomères d'IscU, déstructurée et structurée, ainsi que le dimère diminuent progressivement au profit de formes monomérique et dimérique structurée et de plus hauts poids moléculaires qui deviennent les espèces majoritaires en fin de réaction.

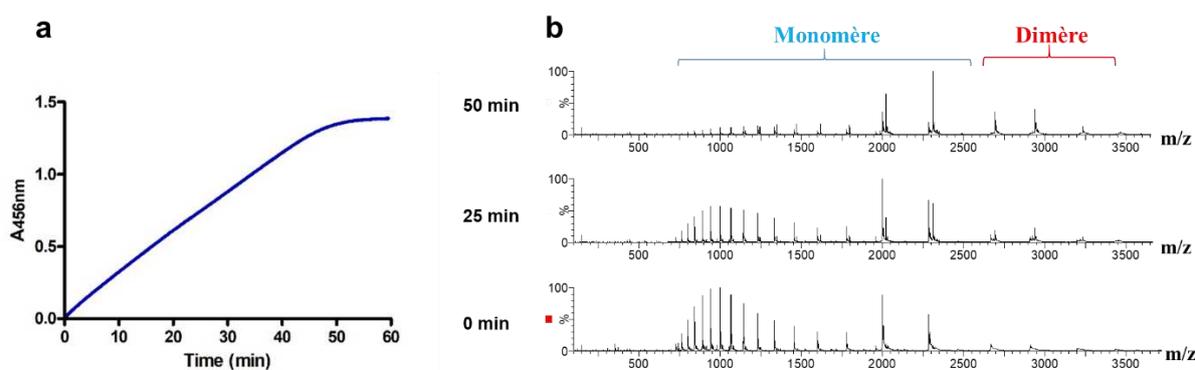


Figure 72 Mise en évidence de la formation d'un dimère d'IscU. **(a)** Cinétique d'assemblage en conditions catalytiques suivie à 456 nm avec 200 μM d'IscU, 5 μM IscS, 5 μM Fdx/FdxR en présence de 2 équivalents d'ions Fe^{2+} et L-cystéine et 400 μM de NADPH. Cette cinétique d'assemblage est une cinétique témoin pour les expériences de spectrométrie de masse native. **(b)** Spectres de spectrométrie de masse native après reconstitution en conditions catalytiques à différents temps (0, 25 et 50 minutes). La zone représentant les états de charges du monomère est en bleu et la zone représentant les états de charge du dimère en rouge.

En zoomant sur un seul état de charge du monomère, on observe que les monomères correspondant à apo-IscU (colonne bleue) et Fe-IscU (colonne jaune) diminuent au cours du temps pour laisser place à une espèce possédant une masse additionnelle de 174 ± 1 Da compatible avec un centre $[\text{2Fe2S}]$ (colonne verte) (Figure 73, partie gauche et Tableau#7). Dans la région du dimère, on observe que le dimère apo (Figure 73, partie droite, colonne marron) diminue au profit d'une espèce dimère possédant une masse additionnelle de 350 ± 2 Da compatible avec deux centres $[\text{2Fe2S}]$ (Figure 73, partie droite, colonne violette et Tableau#7). Au temps intermédiaire, à 25 minutes, on observe l'apparition d'une espèce dimérique avec une masse additionnelle de 176 ± 2 Da compatible avec la présence d'un seul centre $[\text{2Fe2S}]$ (Figure 73, partie droite, colonne rose et Tableau #7). Cette espèce est transitoire car elle est absente à 0 et 50 minutes de réaction.

Caractérisation de la machinerie ISC chez E. coli)

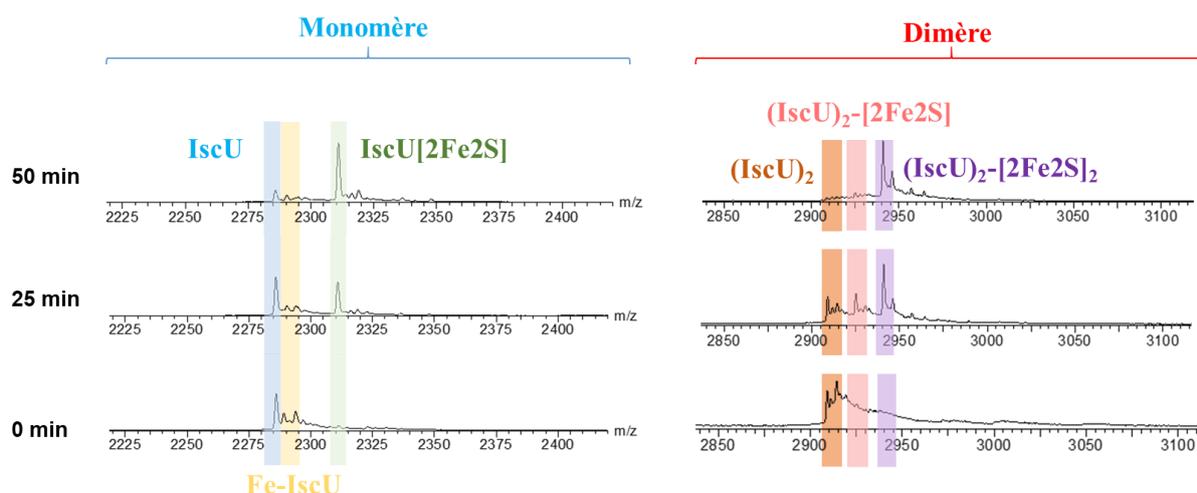


Figure 73 Zoom des spectres de spectrométrie de masse native sur un état de charge correspondant à un monomère et à un dimère. Un seul état de charge pour le monomère et le dimère sont représentés. Le monomère d'apo/Fe-IscU (partie bleue et jaune) diminue au cours de la réaction et se transforme en un monomère d'IscU avec une masse supplémentaire de 174 ± 1 Da compatible avec la présence d'un centre $[2Fe_2S]$ (partie verte). Le dimère d'apo/Fe-IscU est présent avant la réaction (partie orange). Cependant au cours de la cinétique, un dimère transitoire apparaît à 25 minutes avec une masse supplémentaire de 176 ± 2 Da correspondant à un dimère d'IscU avec un centre $[2Fe_2S]$ (partie rose). En fin de réaction cette espèce disparaît au profit d'une nouvelle espèce avec une masse supplémentaire de 350 ± 2 Da compatible avec un dimère d'IscU en présence de deux centres $[2Fe_2S]$ (partie violette).

Masses expérimentales (Da)	attribution
15996 ± 1	Apo-IscU
16052 ± 1	Fe-IscU
16170 ± 1	IscU- $[2Fe_2S]$
31989 ± 2	IscU-IscU
32165 ± 2	IscU-IscU- $[2Fe_2S]$
32339 ± 2	IscU-IscU- $[2Fe_2S]_2$

Tableau 7 Tableau récapitulatif des masses des différentes espèces obtenues par spectrométrie de masse native.

Nous avons également analysé la réaction à des temps intermédiaires (5, 10, 15, 20, 30, 40 et 50 min) (Figure 74a) et nous avons réalisé des quantifications des espèces (Figure 74b). Les résultats de ces analyses, confirment que les formes monomériques (structurée et déstructurée) et dimériques apo disparaissent au profit de deux espèces, un monomère avec un seul centre $[2Fe_2S]$ et un dimère avec deux centres $[2Fe_2S]$, ainsi qu'une espèce transitoire dimérique avec un seul centre $[2Fe_2S]$. Ces résultats confirment donc la formation d'une espèce transitoire dimère avec un seul centre $[2Fe_2S]$

Caractérisation de la machinerie ISC chez E. coli)

engagée dans la formation du produit final. De plus, le monomère avec un seul centre $[2Fe2S]$ est formé avant le dimère contenant deux centres $[2Fe2S]$, ce qui suggère que le dimère est un produit de condensation de deux monomères avec un seul centre $[2Fe2S]$.

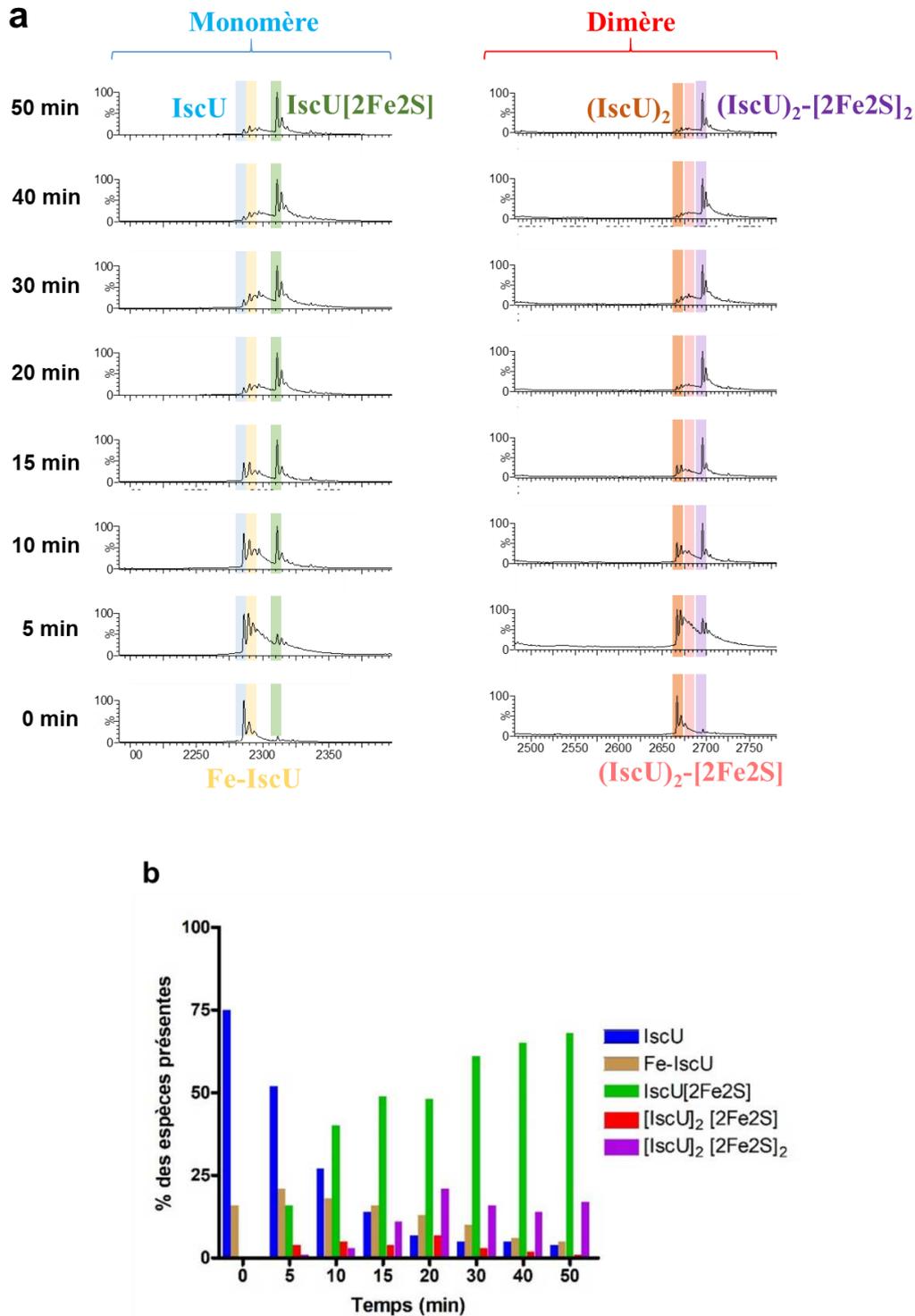


Figure 74 Zoom des spectres de spectrométrie de masse native sur un état de charge correspondant à un monomère et à un dimère. (a) Un seul état de charge pour le monomère et le dimère sont représentés. L'espèce correspondant au monomère d'apoIscU, Fe-IscU, IscU[2Fe2S], [IscU]₂, [IscU]₂[2Fe2S] et [IscU]₂[2Fe2S]₂ sont représentés respectivement en bleu clair, jaune, vert,

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

orange, rose et violet. **(b)** Quantification de l'intensité des pics des spectres de MS native des différentes espèces présentes au cours de l'assemblage des centres Fe-S.

Enfin, pour déterminer si la dimérisation se produit de manière interne dans le complexe IscS-IscU, c'est-à-dire via un changement de conformation du dimère d'IscS comme dans le modèle que nous avons proposé pour le système souris, ou après libération d'IscU, nous avons réalisé des simulations des cinétiques de formation de centres [2Fe2S] en conditions stœchiométriques (**Figure 75**). Nous avons utilisé un modèle bi-moléculaire pour la dimérisation d'IscU libre (dimérisation externe) et un modèle mono-moléculaire pour la dimérisation au sein du complexe IscS-IscU (dimérisation interne). Nous avons également inclus un modèle dans lequel la dissociation d'IscU serait l'étape limitante (échange). Le meilleur accord a été obtenu avec un modèle bi-moléculaire ce qui suggère donc que la dimérisation se produit entre deux intermédiaires IscU-[1Fe1S] libres et que cette étape est cinétiquement limitante après la formation de l'intermédiaire [1Fe1S].

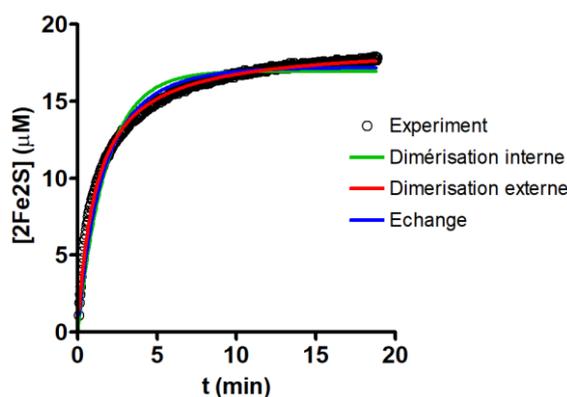


Figure 75 Mécanisme de dimérisation pour former le centre [2Fe2S]. Différentes régressions non linéaires mimant un mécanisme bi-moléculaire, mono-moléculaire d'une cinétique réalisée en conditions stœchiométriques après l'ajout de 2 équivalents de Fe-IscU.

7. Discussion

Mécanisme d'assemblage par la machinerie ISC d'*E. coli*

Dans ce troisième chapitre nous avons étudié le processus d'assemblage par la machinerie ISC d'*E. coli* étape par étape afin de déterminer son mécanisme. Un modèle regroupant l'ensemble des résultats est présenté en **Figure 76**. Nous avons montré que l'insertion du fer dans la protéine IscU est la première étape de ce processus d'assemblage car elle précède l'insertion de soufre (**Figure 76, réaction#1**). Cependant, de même que pour le système souris, il est difficile de dire si l'insertion du fer est réalisée dans apo-IscU libre ou en complexe avec IscS. En présence de L-cystéine, IscS forme un persulfure puis il est transféré de manière fer-dépendant sur une cystéine d'IscU, très probablement la

Caractérisation de la machinerie ISC chez *E. coli*)

cystéine Cys104 comme dans le cas du système souris (**Figure 76, réactions#2 et #3**). Il est important de noter qu'un seul persulfure est transféré sur IscU. Les études précédentes montrant une polypersulfuration d'IscU ont été menées en présence de fortes concentrations de L-cystéine pouvant générer des persulfurations non-spécifiques (Smith & al, 2005 ; Lin & al, 2020). L'équipe de David Barondeau proposait également un processus où l'insertion d'un premier atome de fer active le transfert d'un persulfure puis l'insertion d'un second atome de fer active le transfert d'un second persulfure (Lin & al, 2020). Cependant, nos données ne confirment pas ces résultats. Ces études ne montraient en réalité qu'une très faible proportion d'IscU avec deux persulfures.

Nous avons également trouvé que Fdx réduit le persulfure d'IscU comme son homologue FDX2 chez les eucaryotes (**Figure 76, réaction#4**). Fdx semble donc être le réducteur physiologique dans ce processus, ce qui explique pourquoi cette protéine est essentielle *in vivo* (Jung & al, 1998 ; Lange & al, 2000). Nos résultats suggèrent que la réduction conduit à une espèce Fe(II)-SH stable, que nous avons appelé intermédiaire [1Fe1S] qui se dissocie d'IscS par échange avec Fe-IscU et dimérise pour former un centre binucléaire [2Fe2S] pontant (**Figure 76, réaction#5**). Cette espèce dimérique est transitoire, elle est convertie en une forme monomérique avec un seul centre [2Fe2S] puis dimérique contenant deux centres [2Fe2S] (**Figure 76, réaction#6**). L'existence d'une forme dimérique avec deux centres [2Fe2S] a été confirmée très récemment avec la structure cristallographique d'un dimère d'IscU de *M. thermoacetophila* liant deux centres dans chaque monomère (**Figure 77**) (Kunichika & al, 2021). Enfin, nos résultats indiquent que seuls des centres [2Fe2S] sont formés, comme pour la machinerie eucaryote, ce qui semble exclure un rôle de cette machinerie dans la biosynthèse des centres [4Fe4S].

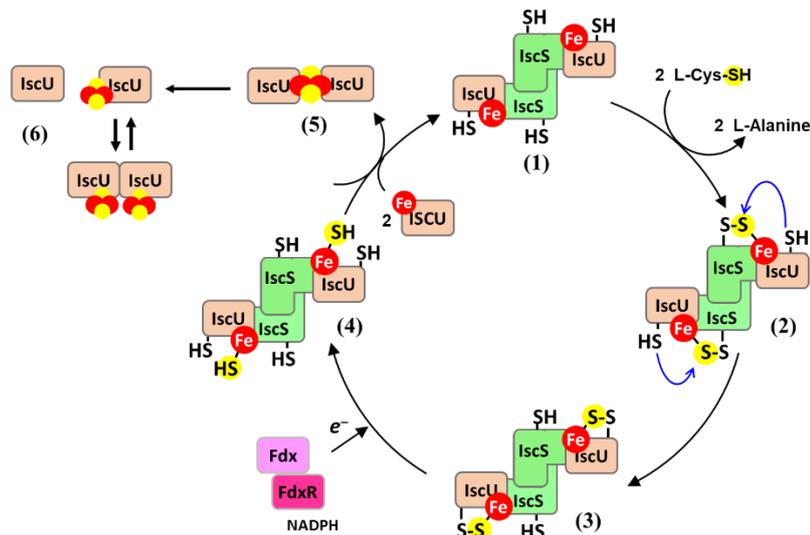


Figure 76 Modèle d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC procaryote. (1) Formation d'un complexe entre IscS et IscU et insertion du fer au sein d'IscU ; (2) Le cofacteur PLP d'IscS catalyse la désulfuration de la L-cystéine afin de former un persulfure sur sa cystéine catalytique ; (3) Ce persulfure est ensuite transféré à la protéine échafaudage IscU de manière fer-dépendante ; (4) Ce persulfure est ensuite réduit par Fdx menant à un intermédiaire Fe(II)-SH sur IscU noté précurseur [1Fe1S] ; (5) La dissociation d'IscU-[1Fe1S] est initiée par la fixation de deux nouvelles molécules de

Caractérisation de la machinerie ISC chez E. coli)

Fe-IscU permettant ainsi à deux IscU-[1Fe1S] de dimériser pour former un centre binucléaire [2Fe2S] ; (6) Le produit final de la réaction est présent sous deux formes différentes : soit un centre [2Fe2S] sur un monomère d'IscU ou soit deux centres [2Fe2S] dans un dimère d'IscU.

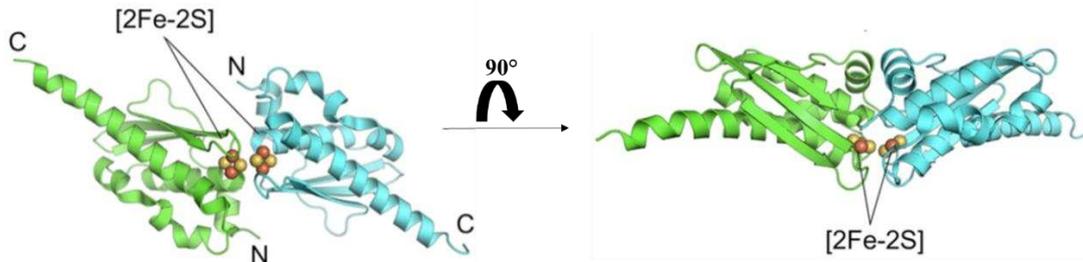
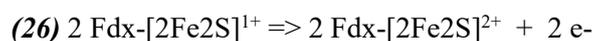
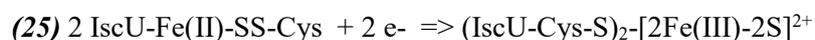
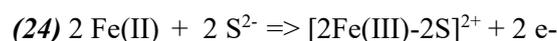
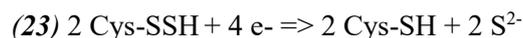
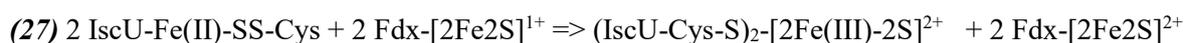


Figure 77 Structure cristallographique du dimère d'IscU de *M. thermoacetophila* liant deux [2Fe2S]. (Issue de Kunichika & al, 2021).

Mécanisme de réduction par Fdx et de formation du centre [2Fe2S]

L'analyse RPE de l'intermédiaire [1Fe1S] montre qu'après réduction par Fdx, le fer est dans un état d'oxydation +II. Il semble donc que la formation de centre [2Fe2S] passe par la formation d'une espèce Fe(II)-SH qui dimériserait pour former un centre [2Fe2S]⁰. Ce type de centres [2Fe2S] dit « super-réduits » ont déjà été isolés et caractérisés dans des complexes inorganiques et des protéines, ce qui conforte cette hypothèse (Im & al, 1995 ; Im & al, 1997 ; Leggate & al, 2004 ; Albers & al, 2013 ; Schneider & al, 2021). De plus, une dimérisation de deux espèces réduites, Fe(II)-SH, plutôt qu'oxydée Fe(III)-SH, pourrait être facilitée pour des raisons électrostatiques, une espèce Fe(III)-SH possédant une charge positive supplémentaire par rapport à une espèce Fe(II)-SH. Le centre [2Fe2S]⁰ serait ensuite oxydé en centre [2Fe2S]²⁺ par un processus qui reste à déterminer. Mais nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Pour cela, il faut considérer l'équation bilan de cette réaction en terme d'électrons avec d'une part, la réduction de persulfure (équation 23) et d'autre part, l'état redox du fer entre l'état initial et final (équation 24), pris séparément puis au sein d'IscU (équation 25) et enfin l'apport d'électrons par Fdx (équation 26) pour conduire à la réaction bilan totale (équation 27).





L'équation bilan indique que la réaction est équilibrée avec l'apport d'un électron par Fdx, soit 0,5 équivalent en NADPH, ce qui est compatible avec nos données montrant que la réaction produit la même quantité de centres Fe-S avec 0,5 et 1 équivalent de NADPH. Cependant, en supposant que la dimérisation en centre [2Fe2S] passe nécessairement par la formation de l'espèce Fe(II)-SH, alors Fdx va donner deux électrons successivement à cette première étape, soit 1 équivalent de NADPH, et donc dans les conditions d'assemblage avec 0,5 équivalent de NADPH, seulement 50 % des persulfures d'IscU seraient réduits et donc moitié moins de centres [2Fe2S] seraient formés qu'avec 1 équivalent de NADPH, ce qui n'est pas le cas. Ces données indiquent donc que Fdx doit être régénérée sous forme réduite par un autre processus que celui impliquant FdxR et le NADPH. Notre hypothèse est que cette régénération est réalisée par le centre super réduit, [2Fe2S]⁰, nouvellement formé, car il est présent sous forme oxydée, [2Fe2S]²⁺, en fin de réaction. Cette régénération de Fdx réduite deviendrait cinétiquement limitante avec 0,5 équivalent de NADPH, ce qui permettrait d'expliquer le ralentissement de la réaction d'assemblage dans ces conditions. Par contre, en présence d'1 équivalent de NADPH, l'oxydation du centre [2Fe2S]⁰ serait également effectuée par ce processus, mais ne serait plus cinétiquement limitante car le NADPH en excès permettrait de réduire la totalité des persulfures sans avoir besoin de régénérer de la Fdx réduite. Une hypothèse alternative pouvant aussi expliquer le ralentissement de la réaction à 0,5 équivalent NADPH, serait que la seconde réduction par Fdx, c'est-à-dire la réduction de l'espèce Fe(III)-SH en Fe(II)-SH, soit lente, plus lente que la dimérisation de l'espèce Fe(III)-SH en centre [2Fe2S]²⁺. Mais cette réaction ne serait pas aussi rapide que la fusion de deux espèces Fe(II)-SH et donc induirait un ralentissement de la réaction. Au final, ces deux hypothèses convergent et suggèrent que la réaction la plus efficace est la fusion de deux espèces Fe(II)-SH conduisant à la formation d'un centre [2Fe2S]⁰. Cela nous amène alors à la question de la nature de l'oxydant permettant de transformer le centre [2Fe2S]⁰ en [2Fe2S]²⁺. Dans nos conditions, Fdx semble être capable de réaliser cette réaction, il est donc possible qu'*in vivo* cela soit également le cas. Mais d'autres oxydants pourraient également jouer ce rôle étant donné la très forte réactivité du centre super-réduit, notamment l'oxygène et le GSSG, or cela conduirait à la production de ROS. Il semble donc que ce processus soit finement contrôlé *in vivo* pour éviter un stress oxydant, mais la nature de l'oxydant reste à établir.

Chapitre 6 Dépendance en frataxine des machineries ISC

Ce dernier chapitre est consacré à l'étude du rôle de CyaY, la frataxine bactérienne, dans l'assemblage des centres Fe-S et aux différences qu'il existe entre les organismes procaryotes et eucaryotes. Nous avons notamment mené des études cinétiques avec la méthode ARBS pour évaluer l'effet de CyaY à chaque étape du mécanisme d'assemblage. Nous avons également évalué l'effet de CyaY sur la distribution du persulfure d'IscS entre différentes protéines acceptrices de persulfure : IscU, TusA et ThiI. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre les raisons de la moindre dépendance des organismes procaryotes vis-à-vis de la frataxine par rapport aux eucaryotes, notamment via l'étude du mutant en position 106 dans la protéine IscU qui semble contrôler ce phénomène.

1. Rôle de la frataxine bactérienne CyaY dans la machinerie d'assemblage ISC.

1.1 Contexte de l'étude

Les données *in vivo* les plus récentes, ont montré que CyaY avait un effet spécifique sur l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC, avec une diminution d'environ 50% de la quantité de centres Fe-S synthétisés. Cet effet est révélé dans des conditions riches en fer, ce qui semble indiquer que l'effet de CyaY sur la machinerie ISC est fer-dépendant. Cependant, cet effet sur l'assemblage ne se traduit pas par un phénotype aussi drastique que chez les eucaryotes: aucun défaut de croissance n'est constaté en absence de CyaY ; le seul phénotype observé est un défaut de croissance lorsque ces cellules sont en co-culture avec des cellules sauvages. Les premières études *in vitro* ont montré que CyaY régulait négativement la formation des centres Fe-S. En effet, l'équipe du Dr. Annalisa Pastore a montré que CyaY inhibait l'activité cystéine désulfurase d'IscS et par conséquent inhibait la formation des centres Fe-S mais dans des reconstitutions d'assemblage utilisant du DTT comme réducteur (Adinolfi & al, 2009). Cet effet inhibiteur étant plus prononcé en présence de fer libre, cela suggérait un rôle fer-dépendant. Or, cet effet est totalement l'inverse de celui d'activateur décrit pour la frataxine eucaryote. Nous avons donc voulu étudier le rôle de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC procaryote complète, ce qui n'avait pas encore été réalisé.

1.2 Effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S

1.2.1 Effet de CyaY en conditions pauvres en fer

Pour étudier l'effet de CyaY sur la vitesse d'assemblage, les reconstitutions ont été réalisées comme précédemment avec l'ajout L-cystéine pour initier la réaction. Les cinétiques montrent de manière surprenante que CyaY n'a aucun effet, ni sur la vitesse globale d'assemblage qui reste égale à

Dépendance en frataxine des machineries ISC

$1,9 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$, ni sur le rendement en centre Fe-S qui correspond au plateau (**Figure 78**). Par contre, dans des réactions effectuées en absence du couple réducteur Fdx/FdxR, où le réducteur est la L-cystéine, on observe une inhibition de la réaction par CyaY (**Figure 78**). Ces résultats confirment les observations précédentes montrant un effet inhibiteur de CyaY dans les réactions DTT-dépendantes, mais cette réaction étant considérée comme non physiologique, cet effet inhibiteur ne permet pas d'expliquer l'effet de CyaY *in vivo*. Bien que nos reconstitutions avec Fdx au lieu du DTT soient plus proches des conditions physiologiques, nous n'avons pas observé d'effet stimulateur de CyaY comme on pouvait s'y attendre d'après les constatations *in vivo*. L'une des raisons pourrait être que nos réactions ont été réalisées en absence de fer libre, la totalité du fer étant complexé par IscU, ce qui pourrait correspondre à une situation pauvre en fer *in vivo*, et pourrait expliquer l'absence d'effet de CyaY. Nous avons donc testé des conditions dites « riches en fer » en ajoutant du fer libre aux réactions de reconstitution.

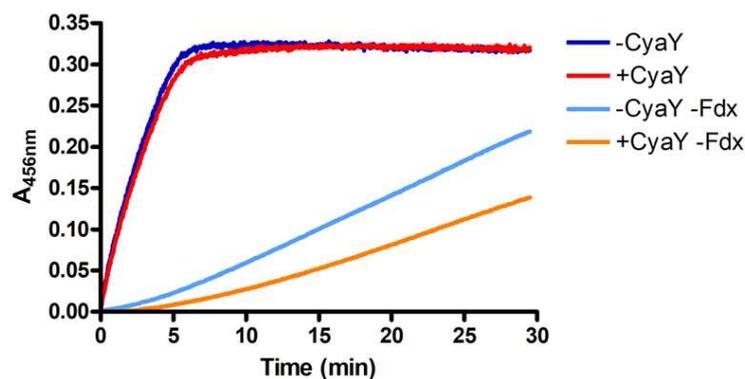


Figure 78 Effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S. Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec le couple Fdx/FdxR en présence (courbe rouge) ou absence (courbe bleue) de CyaY. Des cinétiques d'assemblage sont également réalisées sans le couple Fdx/FdxR en présence (courbe orange) ou absence (courbe bleue claire) de CyaY.

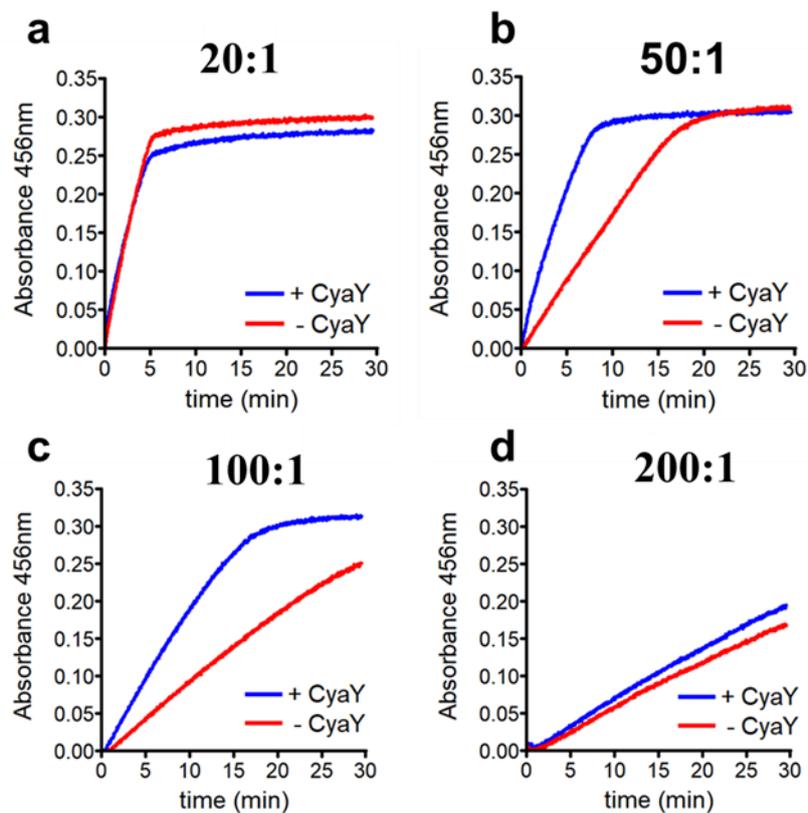
1.2.2 Effet de CyaY sur l'assemblage en conditions riches en fer

Nous avons réalisé des réactions d'assemblage avec différents ratios de Fe^{2+} par rapport au complexe IscS-IscU-Fdx de 20:1 à 200:1 (**Figure 79**). Jusqu'à un ratio de 20:1, aucun effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S n'est observé, avec une vitesse de l'ordre de $1,9 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 79a,e**). Lorsque l'on augmente le ratio de Fe^{2+} par rapport au complexe IscS-IscU-Fdx, on observe un effet inhibiteur du fer qui augmente à mesure que sa concentration augmente. Cet effet est étonnant nous allons y revenir. Cependant, lorsque les assemblages sont effectués avec des ratios de 50:1 à 100:1, un effet accélérateur ou protecteur de CyaY est observable (**Figure 79b,c**). Cet effet est d'un facteur

Dépendance en frataxine des machineries ISC

environ 2,5 à ces ratios (**Figure 79e**). Lorsque le ratio atteint 200:1, l'effet de CyaY semble plus modéré, il semble que l'effet inhibiteur du fer domine dans ces conditions (**Figure 79d**).

Il semble donc que CyaY ait un effet « positif » sur l'assemblage dans des conditions qui pourraient s'apparenter aux conditions « riches en fer » *in vivo*. Cependant, l'effet inhibiteur du fer est totalement surprenant et n'a pas encore été rapporté ni *in vivo*, ni *in vitro*. Il est donc nécessaire dans un premier temps d'étudier son effet pour pouvoir appréhender l'effet de CyaY. Le fer pourrait avoir un effet ralentisseur, soit sur l'étape cinétiquement limitante du processus, soit sur une autre étape qui deviendrait alors l'étape cinétiquement limitante. Le fer pourrait également interférer avec la formation des complexes entre IscU, IscS et Fdx, ce qui produirait également un effet sur la vitesse globale de la réaction. Pour comprendre cet effet, nous avons donc étudié l'effet du fer et de CyaY à chaque étape de l'assemblage, en cherchant, en parallèle, à déterminer l'étape cinétiquement limitante.



Dépendance en frataxine des machineries ISC

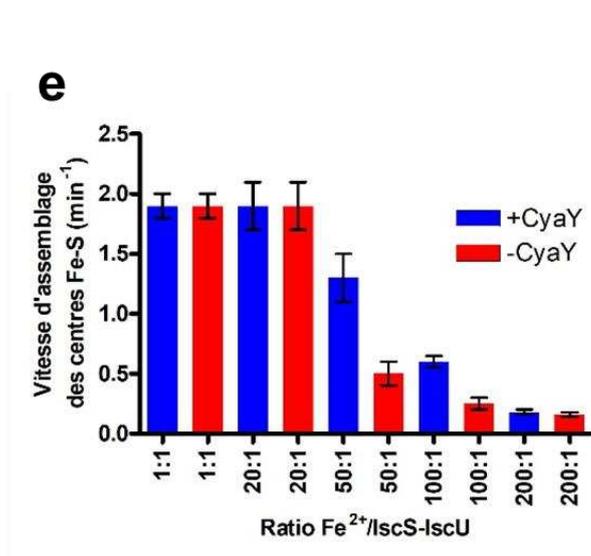


Figure 79 Effet d'un excès de fer sur l'assemblage des centres Fe-S. (a-b-c-d) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec Fe-IscU avec différents ratios de Fe²⁺/IscS-IscU. Le ratio est indiqué en gras sur chaque cinétique. (e) Vitesse d'assemblage des centres Fe-S en fonction du ratio Fe²⁺/IscS-IscU en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

1.3 Effet du fer et de CyaY sur la formation du persulfure d'IscS

Pour étudier l'effet du fer sur la formation de persulfure par IscS, nous avons dans un premier temps analysé les cinétiques de génération de persulfures par IscS en absence et présence d'IscU, sous forme apo pour empêcher le transfert. La formation du persulfure d'IscS est extrêmement rapide (moins de 10 secondes) en présence ou absence de CyaY, et apo-IscU n'a pas d'effet sur cette cinétique (**Figure 80a**). Nous avons alors regardé l'effet du fer sur la formation du persulfure d'IscS seule. Lorsque IscS est incubé avec 100 équivalents de fer dans le milieu réactionnel (correspondant au ratio 100:1), le persulfure est également formé très rapidement, en moins de 10 secondes, aussi bien en absence qu'en présence de CyaY (**Figure 80b**). Bien que nous ne puissions pas suivre la formation de persulfure en dessous de 10 secondes pour voir si le fer aurait un effet à des temps plus courts, nous verrons par la suite que cette réaction n'étant pas cinétiquement déterminante, même s'il y a un effet du fer, celui-ci n'aura pas d'impact sur la cinétique globale d'assemblage.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

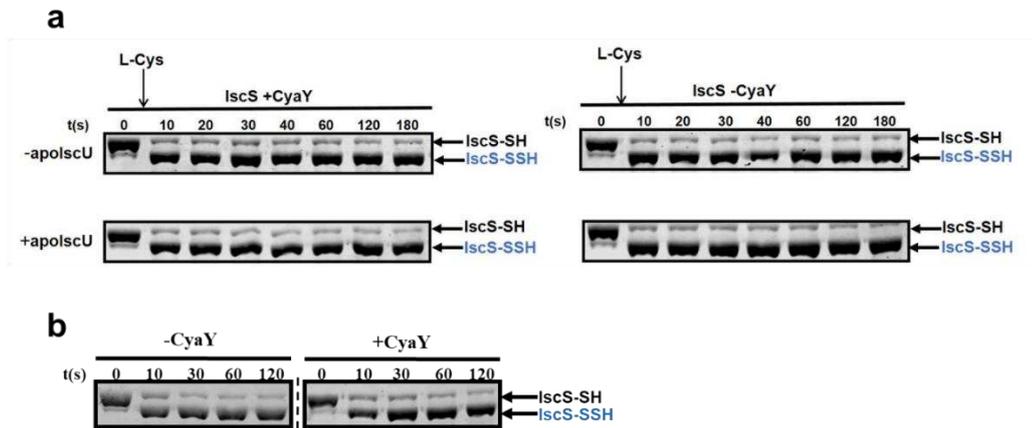


Figure 80 Formation du persulfure d'IscS en fonction d'apo-IscU, de CyaY et du fer. (a) Persulfidation d'IscS suivie par la méthode ARBS initiée par l'ajout de 1 équivalent de L-cystéine en présence ou absence de CyaY et d'apo-IscU. Les échantillons sont chargés sur gel SDS-PAGE 10 %. (b) Persulfidation d'IscS seule en présence de 100 équivalents d'ions Fe^{2+} suivie par la méthode ARBS initiée par l'ajout de 1 équivalent de L-cystéine. Les échantillons sont chargés sur gel SDS-PAGE 10 %.

1.4 Effet du fer et de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU

1.4.1 Effet de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU en conditions pauvres en fer

Nous avons ensuite étudié le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU. Nous avons commencé par étudier les cinétiques de transfert de persulfure en absence de fer, pour cela, IscS a été pré-incubé avec 1 équivalent de L-cystéine puis la protéine IscS persulfurée a été incubée avec 1 équivalent de Fe-IscU en présence ou absence de 1 équivalent de CyaY. Nous pouvons observer qu'en absence de CyaY la forme non persulfurée d'IscU (IscU +3) disparaît très rapidement (environ 2 minutes) au profit de la forme persulfurée (IscU +2) avec une vitesse de l'ordre de $1,7 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 81a en condition réductrice,c,d**). Ce résultat est surprenant et différent de la machinerie eucaryote où le transfert de persulfure de NFS1 vers Fe-ISCU est l'étape la plus lente (15 minutes environ pour totalement persulfurer ISCU en absence de FXN). Nous reviendrons sur ce résultat important dans la prochaine section. Nous pouvons aussi remarquer la présence de deux espèces minoritaires ayant perdu soit 2 (IscU +1) ou 3 (IscU +0) unités d'alkylation qui augmentent au cours du temps. Les gels réalisés en conditions non réductrices permettent de confirmer les résultats préalablement obtenus dans le **chapitre#5**, montrant que les espèces IscU +1 et IscU +0 ne sont pas des persulfures (**Figure 81a, en condition non réductrice**). Nous pouvons observer qu'en présence de CyaY le transfert de persulfure est un peu plus rapide avec une vitesse de l'ordre de $2,4 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 81b en condition réductrice,c,d**).

Dépendance en frataxine des machineries ISC

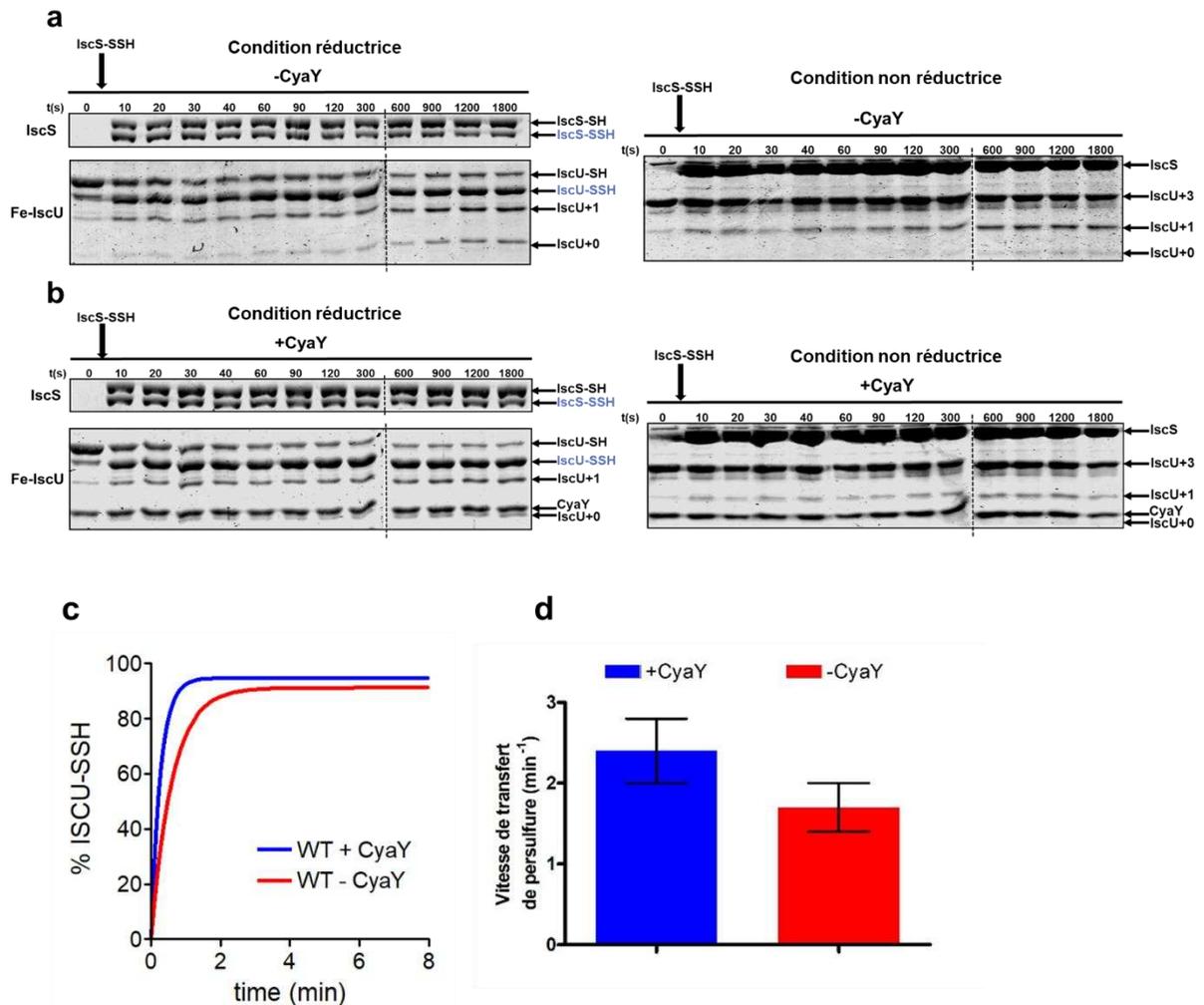


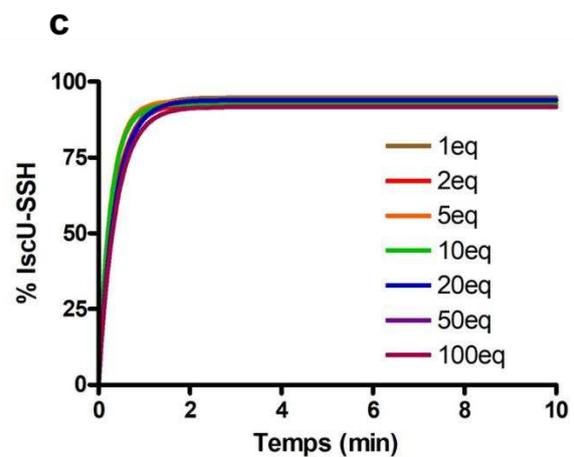
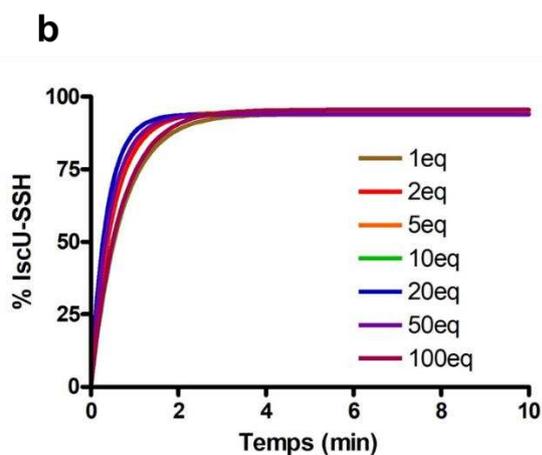
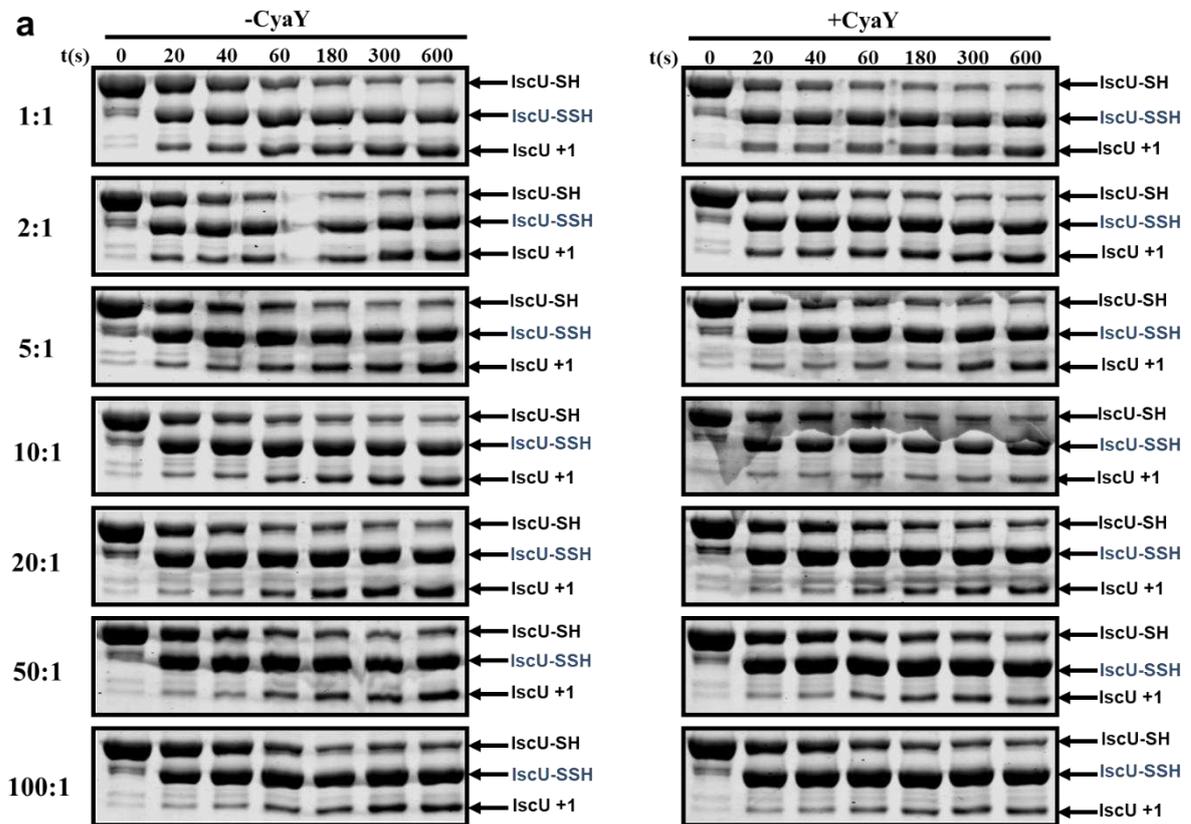
Figure 81 Effet de CyaY sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU. (a-b) Persulfidation de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS initiée par l'incubation d'IscS pré-persulfurée en absence (a) ou présence (b) de CyaY. Les échantillons de ces alkylations supplémentés par du β -mercaptoéthanol (gel de gauche) ou sans β -mercaptoéthanol (gel de droite) sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % et 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU. (c) Quantification de la forme persulfurée d'IscU à partir des gels SDS-PAGE (a-b). (d) Vitesse de transfert de persulfure entre IscS et IscU en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

1.4.2 Effet de CyaY sur le transfert de persulfure à IscU en conditions riches en fer

Les cinétiques de transfert de persulfures réalisées en présence de fer libre à des ratios compris entre 1:1 et 100:1 par rapport au complexe IscS-IscU, montrent que le fer n'a pas d'effet inhibiteur sur le transfert (Figure 82). À l'inverse, nous pouvons même remarquer une légère accélération entre les ratios 2:1 et 50:1 (Figure 82). Il est possible que cet effet accélérateur soit dû à une certaine labilité du fer dans IscU, notamment dans le tampon phosphate qui est utilisé pour réaliser les tests ARBS ; le flux constant entre le fer présent dans le milieu réactionnel et dans IscU permettrait de favoriser la métallation d'IscU en présence de fer libre et conduirait donc à une augmentation de la vitesse apparente de transfert de persulfure. La vitesse maximale pouvant être atteinte est de l'ordre de $2,8 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ en valeur

Dépendance en frataxine des machineries ISC

moyenne sur l'ensemble des expériences réalisées en présence de fer libre. Ces expériences montrent également qu'en présence de CyaY, la vitesse maximale est atteinte sans fer libre. Il semble donc que CyaY stabilise le fer au sein du complexe IscS-IscU. En conclusion, l'excès de fer n'inhibe pas l'étape de transfert de persulfure et CyaY semble avoir un effet stabilisateur sur le fer dans le complexe IscS-IscU.



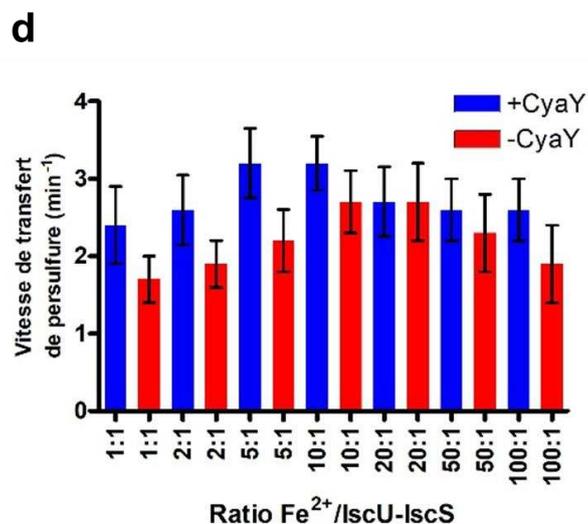


Figure 82 Effet du fer dans le milieu réactionnel et de CyaY sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU. Persulfidation de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS avec différents ratios de Fe²⁺/IscS-IscU (1:1 ; 2:1 ; 5:1 ; 10:1 ; 20:1 ; 50:1 ; 100:1), initiée par l'ajout de L-cystéine en absence (**gel de gauche**) ou présence (**gel de droite**) de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser IscU. (**b-c**) Quantification de la forme persulfurée d'IscU à partir des gels SDS-PAGE présenté en (**a**) en absence (**b**) ou présence (**c**) de CyaY. (**d**) Vitesse de transfert de persulfure entre IscS et IscU en fonction du ratio Fe²⁺/IscS-IscU en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

1.5 Effet du fer et de CyaY sur la réduction de persulfure par Fdx

1.5.1 Effet de CyaY sur la réduction du persulfure d'IscU en conditions pauvres en fer

Nous avons ensuite évalué l'effet du fer et de CyaY sur la réduction du persulfure d'IscU par la ferrédoxine Fdx. Nous avons dans un premier temps évalué l'effet de Fdx en conditions dites « pauvres » en fer c'est-à-dire sans fer libre dans le milieu réactionnel. Pour cela, le complexe IscS-IscU a été incubé avec 1 équivalent de Fe²⁺ et de L-cystéine, puis 1 équivalent de Fdx/FdxR avec 2 équivalents de NADPH sont ajoutés lorsque le transfert de persulfure est terminé. Le suivi de la cinétique de réduction par Fdx montre que cette étape est plus lente que l'étape de transfert de persulfure (**Figure 83a**). De plus, en présence d'1 équivalent de CyaY la réduction est légèrement ralentie (**Figure 83a, gel de droite**). La quantification des gels et l'analyse cinétique par un modèle mono-moléculaire, identique à celui utilisé pour le transfert de persulfure donne une vitesse de réduction de l'ordre de $0,7 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$ en absence de CyaY et $0,4 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$ en sa présence (**Figure 83b**). La comparaison des vitesses de formation de persulfure, de transfert et de réduction indique que la réduction est l'étape la plus lente, donc potentiellement l'étape cinétiquement limitante. Cependant, la vitesse de réduction est inférieure à la vitesse globale d'assemblage ($1,9 \text{ min}^{-1}$), alors qu'elle devrait être du même ordre de grandeur si c'est l'étape cinétiquement limitante. Nous nous sommes alors demandé si la vitesse de réduction mesurée correspondait à la vitesse maximale. L'une des raisons pouvant être que la concentration en Fdx n'était

Dépendance en frataxine des machineries ISC

pas suffisante pour atteindre cette vitesse, c'est-à-dire que les conditions n'étaient pas saturantes en Fdx. Nous avons alors réalisé des titrations en Fdx afin de déterminer le ratio optimal entre Fdx et le complexe IscS-IscU (**Figure 50c**). Nous avons obtenu une vitesse maximale pour un ratio 1:1. Les cinétiques de réduction ayant été réalisées en présence d'un équivalent de Fdx, la différence entre la vitesse de réduction et celle d'assemblage ne peut pas s'expliquer par un défaut de saturation. Au final, le rapport des vitesses de transfert et de réduction de persulfure étant relativement proche (inférieur à un facteur 10), il est probable que le régime cinétique ne soit pas celui où une seule étape est cinétiquement déterminante. Dans ce cas les deux réactions, transfert et réduction, vont contribuer à la vitesse globale, mais la réaction de réduction est probablement celle qui aura la plus forte influence car c'est la réaction la plus lente.

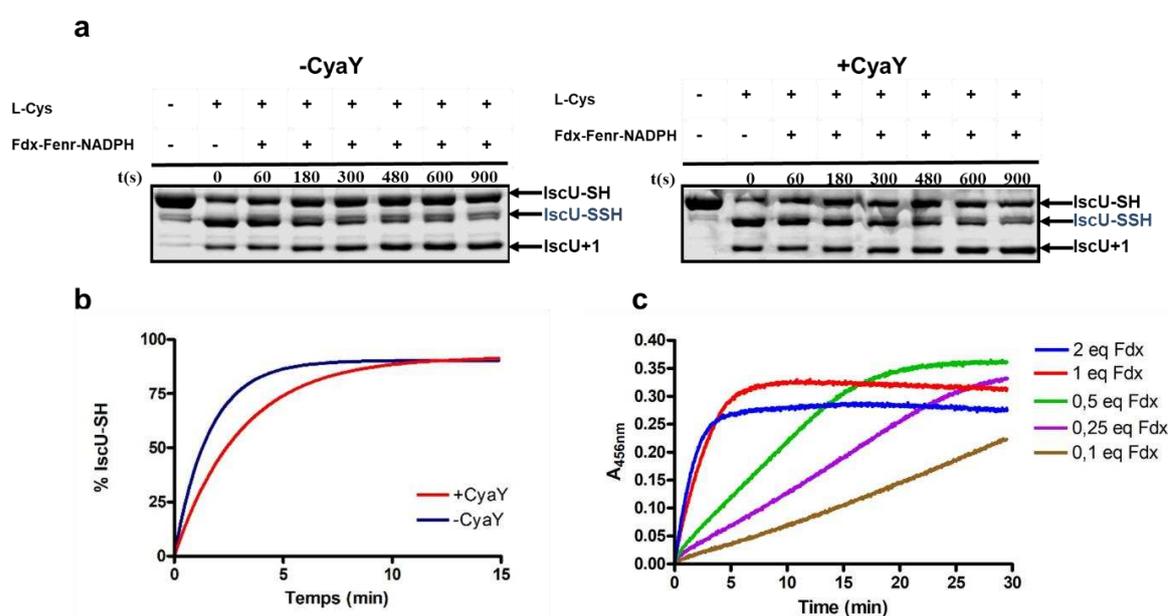


Figure 83 Effet de CyaY sur la réduction du persulfure de Fe-IscU. **(a)** Réduction du persulfure de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS en présence ou absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser IscU. **(b)** Quantification de la forme réduite de Fe-IscU à partir des gels SDS-PAGE **(a)**. **(c)** Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm avec différentes concentrations en Fdx comme indiqué en équivalents molaires.

1.5.2 Effet du fer sur la réduction du persulfure d'IscU à 1 équivalent de L-cystéine

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du fer sur la réduction en présence d'un seul équivalent de L-cystéine. Pour cela, différents ratios de Fe^{2+} /IscS-IscU-Fdx ont été incubés avec 1 équivalent de L-cystéine. Puis, 1 équivalent de Fdx/FdxR avec 2 équivalents de NADPH ont été ajoutés lorsque le transfert de persulfure est terminé. Le fer est donc présent dès le début de la réaction. Pour les ratios inférieurs à 2:1, le fer n'a pas d'effet significatif sur la vitesse de réduction, par contre au-delà 2:1,

Dépendance en frataxine des machineries ISC

la réduction du persulfure d'IscU est partielle, indiquant que le fer perturbe la réduction par Fdx (**Figure 84**). Cependant, aucun effet significatif de CyaY n'est observé permettant d'améliorer la réduction en présence de fer, ce qui ne permet donc pas d'expliquer son effet sur l'assemblage. En regardant plus en détail, nous pouvons observer qu'aux ratios 1:1 et 2:1, IscU n'est pas totalement persulfurée et qu'une proportion d'IscS, de l'ordre de 30%, reste persulfurée également (**Figure 84**). La présence de fer libre au ratio 2:1 ne permet pas non plus d'achever le transfert des 30 % restant sur IscS, il semble donc pas que cela soit dû à un défaut de métallation d'IscU qui pourrait expliquer un transfert partiel. L'une des raisons pouvant expliquer un transfert de persulfure en apparence partiel serait la présence de formes doublement persulfurées, à la fois sur IscS et sur IscU, dans lesquelles le persulfure d'IscS ne peut pas être transféré à IscU car elle est déjà persulfurée. Ce transfert ne pourrait pas non plus avoir lieu après réduction du persulfure d'IscU en intermédiaire [1Fe1S]. De manière étonnante, pour des ratios supérieurs à 2:1, la forme d'IscS persulfurée « disparaît » très rapidement. Il semble donc que le fer soit capable de réduire le persulfure d'IscS et de manière Fdx-dépendante. Pour tester cette hypothèse, nous avons mené des expériences avec deux équivalents de L-cystéine qui permettent d'obtenir uniquement une forme doublement persulfurée.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

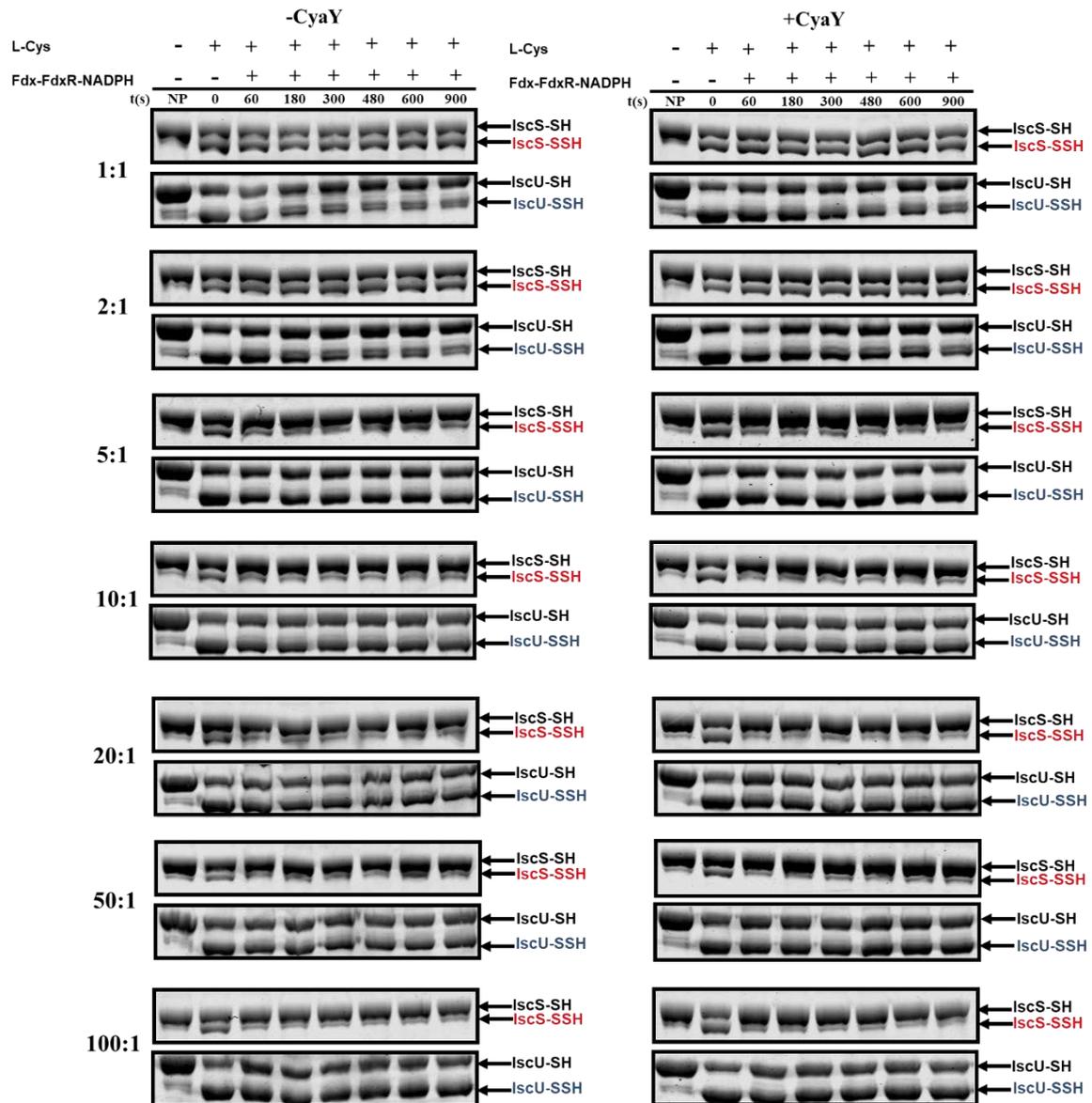


Figure 84 Effet du fer sur la réduction du persulfure de Fe-IscU à 1 équivalent de L-cystéine. Réduction du persulfure de Fe-IscU par Fdx suivie par la méthode ARBS à différents ratios $\text{Fe}^{2+}/\text{IscS-IscU-Fdx}$ en présence ou absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % et 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU.

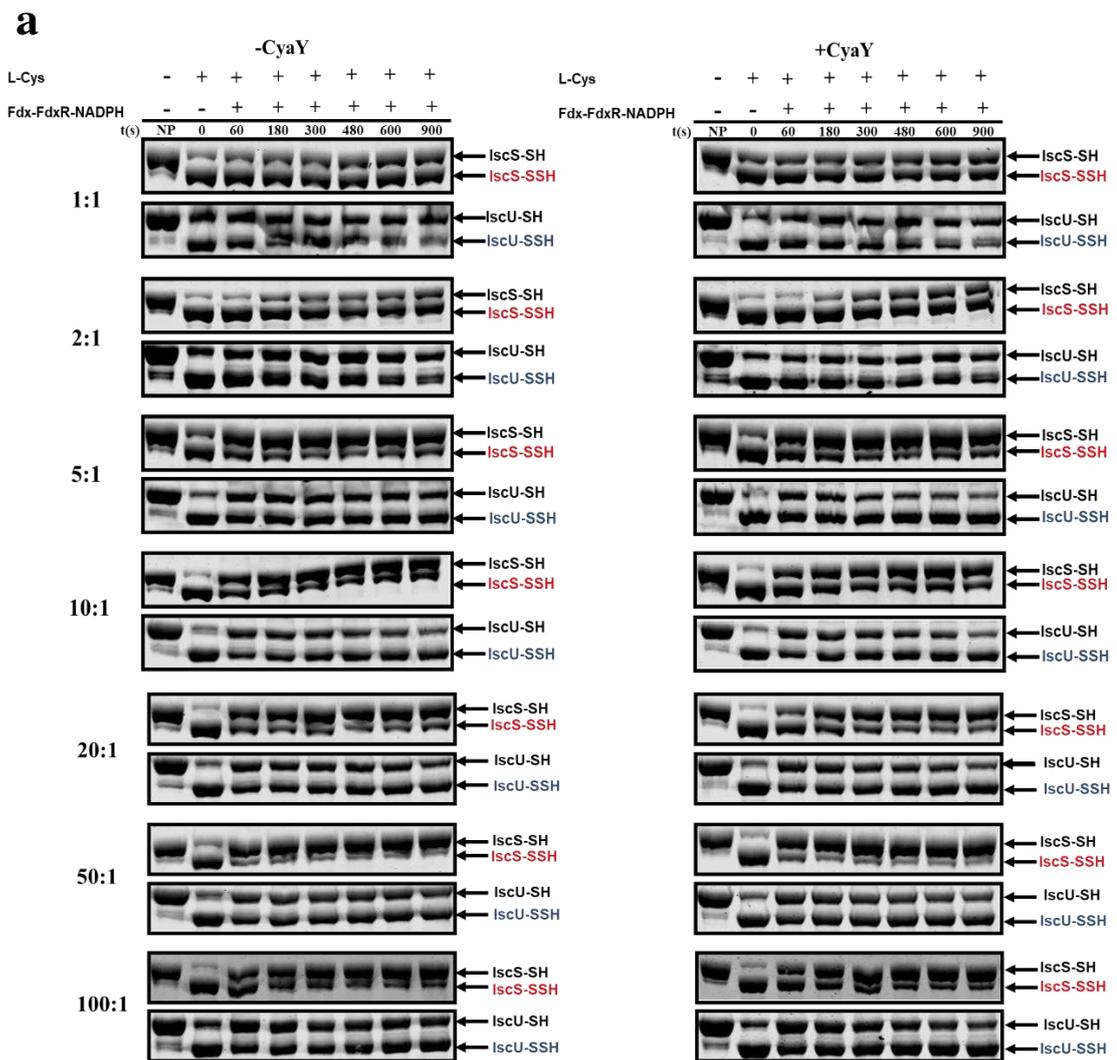
1.5.3 Effet du fer sur la réduction du persulfure d'IscU à 2 équivalents de L-cystéine

Avec 2 équivalents de L-cystéine, on observe plusieurs effets (**Figure 85**). Nous avons tout d'abord analysé les réactions sans CyaY (**Figure 85a,b,c**). En regardant le niveau de persulfuration d'IscS, on constate que pour des ratios supérieurs à 5:1, le fer libre induit la réduction de son persulfure. Il semble également que le fer induise la réduction du persulfure d'IscU. Cet effet accélérateur est particulièrement visible aux temps courts, en comparant les niveaux de persulfuration d'IscU à $t = 0$ et 60s. Au final, ces données suggèrent que le fer libre en excès soit capable de réduire de manière non spécifique les persulfures par une voie Fdx-dépendante. De plus, après 60s, la quantité d'IscU

Dépendance en frataxine des machineries ISC

persulfurée augmente, ce qui suggère qu'un persulfure est à nouveau transféré à la forme réduite d'IscU. Il est possible que le fer s'échange avec l'intermédiaire [1Fe1S] permettant ainsi un nouveau transfert de persulfure.

Nous avons ensuite analysé l'effet de CyaY. En comparant les proportions d'IscS persulfurée à $t = 0, 60s$ et $180s$, on observe une fenêtre de ratios, entre 10:1 et 20:1, pour lesquels le transfert du second persulfure est ralenti en présence de CyaY (**Figure 85a,b,c**). CyaY pourrait donc jouer un rôle protecteur contre le fer libre qui vient réduire de manière non-spécifique les persulfures d'IscS et IscU.



Dépendance en frataxine des machineries ISC

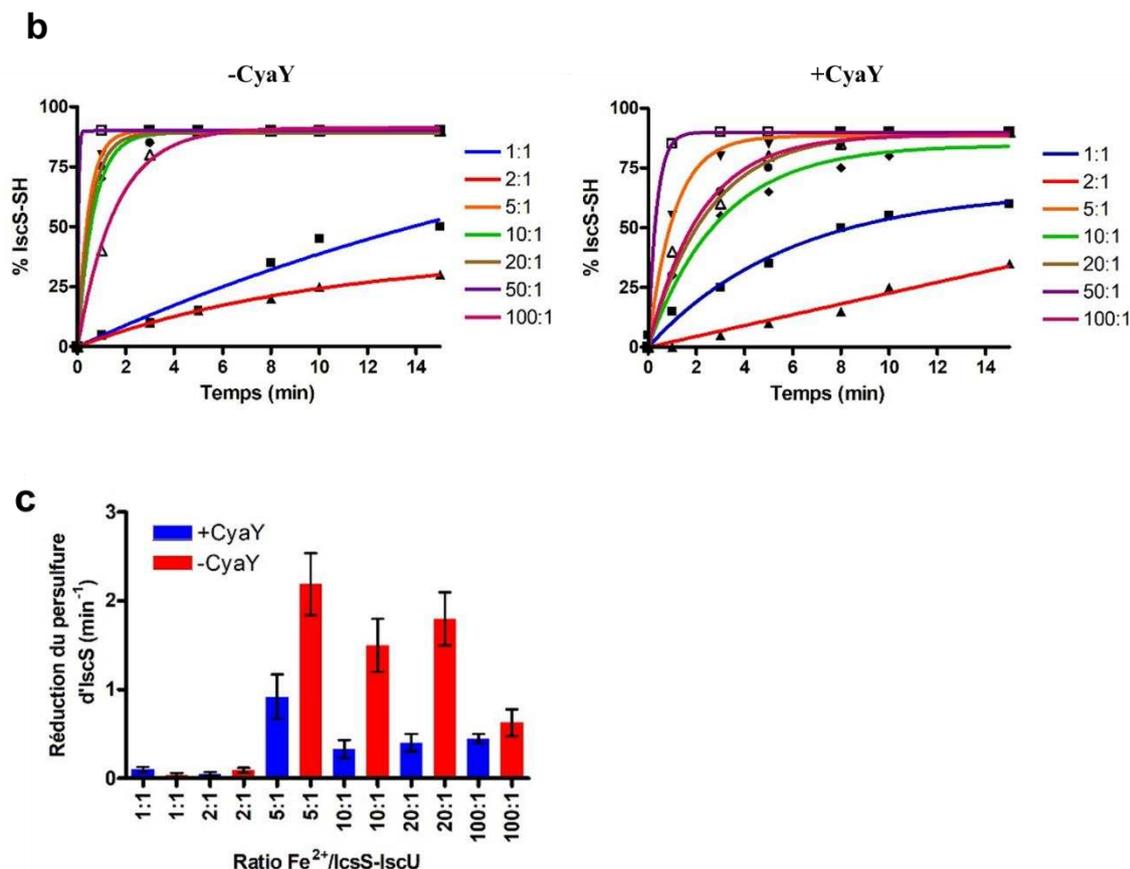


Figure 85 Effet du fer sur la réduction du persulfure de Fe-IscU à 2 équivalents de L-cystéine. **(a)** Réduction du persulfure de Fe-IscU par Fdx suivie par la méthode ARBS à différents ratios $\text{Fe}^{2+}/\text{IscS-IscU-Fdx}$ en présence ou absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % et 14 % pour visualiser respectivement IscS et IscU. **(b)** Quantification du déchargement du persulfure d'IscS à partir des gels SDS-PAGE en **(a)**. **(c)** Vitesse de réduction du persulfure d'IscS en fonction du ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{IscS-IscU}$ en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

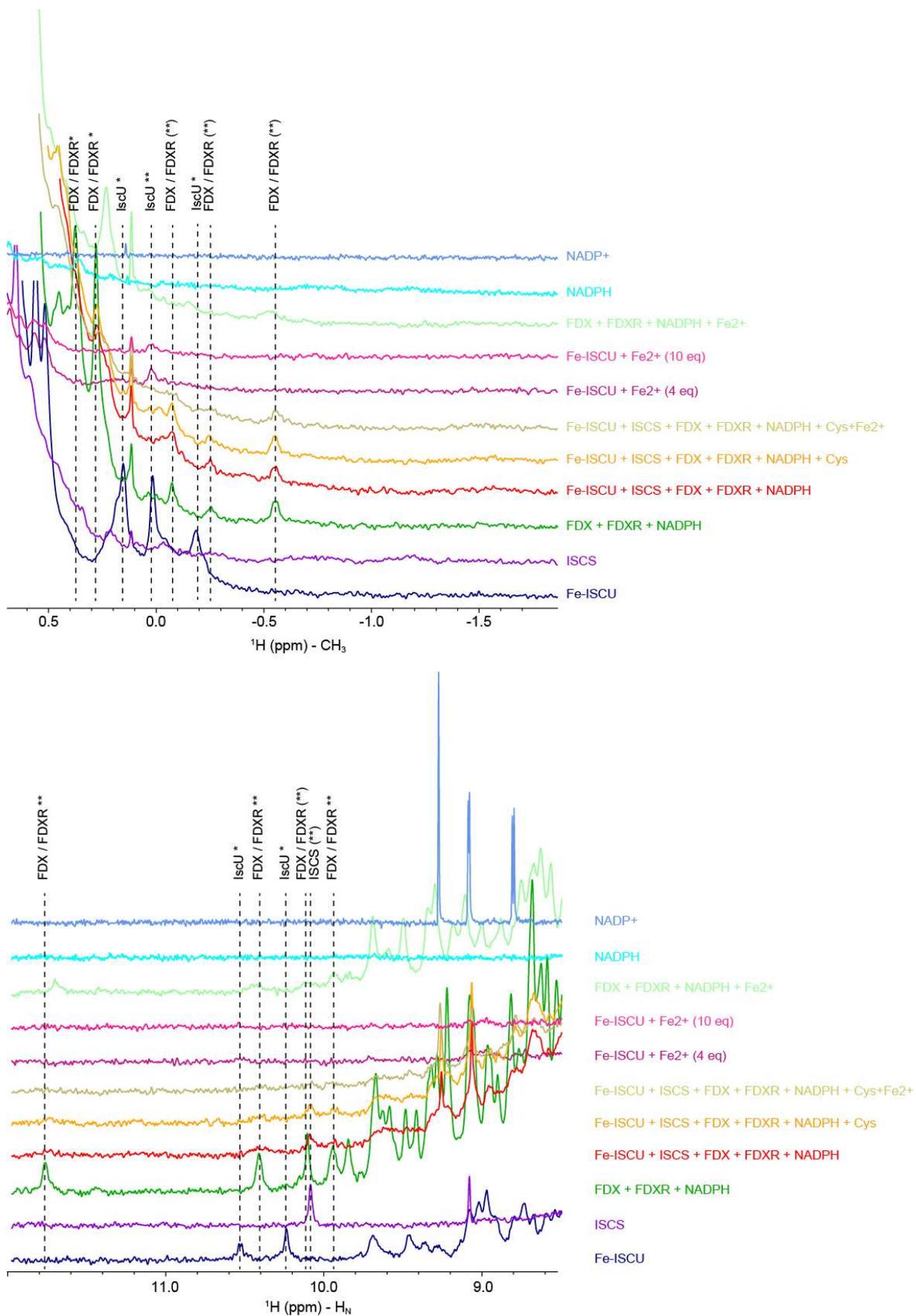
1.6 Effet du fer sur le complexe IscS-IscU

Nous avons montré au chapitre précédent, que le mécanisme de formation de centres $[2\text{Fe}2\text{S}]$ nécessitait la dissociation d'IscU contenant l'intermédiaire $[1\text{Fe}1\text{S}]$ pour dimériser. Nous avons donc analysé l'effet du fer sur la dissociation du complexe IscS-IscU- $[1\text{Fe}1\text{S}]$ par RMN. Nous avons dans un premier temps réalisé des spectres témoins de chaque protéine seule, c'est-à-dire Fe-IscU, IscS et Fdx/FdxR en présence de NADPH (**Figure 86, spectres bleu foncé, violet et vert foncé**). À partir de ces données, nous avons choisi deux zones particulières des spectres, la zone des méthyles entre 0,6 et -1,7 ppm et la zone des protons H_N entre 12 et 9,4 ppm, où nous pouvons détecter des pics caractéristiques de chaque protéine. Le spectre du mélange de toutes ces protéines en présence de NADPH montre la disparition totale des signaux d'IscU et une disparition partielle des signaux d'IscS confirmant bien la formation d'un complexe entre ces deux protéines (**Figure 86, spectre rouge**). Les signaux du couple Fdx/FdxR persistent mais s'élargissent, suggérant une interaction dynamique avec le

Dépendance en frataxine des machineries ISC

complexe IscU-IscS. Lorsque l'on incube ces protéines avec 1 équivalent de L-cystéine, le spectre ne change pas, aucun signal caractéristique d'IscU libre n'est détecté, suggérant bien qu'IscU reste en complexe avec IscS malgré la présence de l'intermédiaire [1Fe1S]. Ce résultat est cohérent avec l'accumulation du complexe IscS-IscU-[1Fe1S] et l'absence de formation de centre [2Fe2S] en conditions stœchiométriques lorsqu'il n'y a pas de Fe-IscU libre pour induire la dissociation d'IscU-[1Fe1S] (**Figure 86, spectre orange**). Nous avons par la suite étudié ce complexe en présence de 10 équivalents de fer. Lorsque l'on incube le complexe IscS-IscU-Fdx avec de la L-cystéine en présence de 10 équivalents de fer, le spectre ne change pas, aucun signal caractéristique d'IscU libre n'est détecté (**Figure 86, spectre kaki**). Cependant, l'absence des signaux caractéristiques d'IscU pourrait être due à un effet paramagnétique du fer sur IscU qui élargit les raies. Nous avons donc étudié l'effet du fer sur IscU. L'intermédiaire IscU-[1Fe1S] ne pouvant pas être isolé sous forme libre (c'est-à-dire en dehors du complexe avec IscS), nous avons utilisé Fe-IscU pour ces expériences. Nous avons préparé un échantillon avec 4 équivalents de fer, car en présence de 10 équivalents, la protéine Fe-IscU précipite (**Figure 86, spectre rose et violet clair**). L'analyse de cet échantillon montre que la plupart des signaux disparaissent, seul un signal aux alentours de 0 ppm est visible (noté IscU**) (**Figure 86, spectre rose et violet clair**). Ce signal étant absent du complexe IscS-IscU avec Fdx/FdxR aussi bien avant qu'après incubation avec la L-cystéine, nous en avons conclu que l'intermédiaire IscU-[1Fe1S] ne se dissociait pas en présence de fer libre. Mais la disparition de la plupart des pics d'IscU libre avec du fer en excès ne permet pas de conclure de manière totalement affirmative.

Dépendance en frataxine des machineries ISC



Dépendance en frataxine des machineries ISC

Figure 86 Effet du fer sur la formation du complexe IscS-IscU-Fdx. Spectre RMN 1D ^1H zoomé dans la région méthyle (CH_3) et dans la région des protons extrême H_N d'IscU, d'IscS et du couple Fdx/FdxR. Les spectres ont été acquis à 293 K à 800 MHz. Les signaux les plus distincts sont annotés de la façon suivante : (*) disparition quasi-complète lié à la formation d'un complexe entre les protéines et disparition complète en présence d'un excès de fer ; (**) disparition quasi-complète lié à la formation d'un complexe entre les protéines sauf dans les contrôles avec du fer en excès ; (***) élargissement partiel des signaux dans le complexe et élargissement équivalent ou plus important dans les contrôles avec du fer en excès.

1.7 Assemblage en conditions stœchiométriques en présence d'un excès de fer

Nous avons par la suite réalisé des reconstitutions d'assemblage de centres Fe-S en conditions stœchiométriques afin de voir si l'intermédiaire $[\text{1Fe1S}]$ est échangé par un atome de fer comme proposé précédemment sur la base des résultats de cinétique de réduction en présence de fer libre (**section A.4**). Cette réaction d'échange pouvant mener à la libération d'une espèce $[\text{1Fe1S}]$ qui pourrait former des centres Fe-S de manière non spécifique, en dehors du complexe IscS-IscU, nous avons passé le mélange réactionnel sur une colonne de dessalage. Après dessalage, une coloration marron reste sur la colonne et l'échantillon élué n'est pas coloré, ce qui indique que le chromophore n'était pas inséré dans IscU. En conclusion, ces résultats suggèrent que le fer en excès s'échange avec l'intermédiaire $[\text{1Fe1S}]$ menant à la formation non spécifique de centres Fe-S en dehors du complexe IscS-IscU ou lié de manière non-spécifique.

1.8 Effet de CyaY sur la distribution du persulfure d'IscS

Etant donné le rôle de FXN dans l'accélération du transfert de persulfure à ISCU dans le système murin, nous nous sommes également demandé si CyaY pourrait être impliquée dans la distribution du soufre par IscS entre IscU et les autres accepteurs de persulfures, notamment en favorisant le transfert à l'une ou l'autre de ces protéines. IscS est la source de soufre, non seulement pour IscU, mais également pour la biosynthèse des cofacteurs molybdène, la thiolation des ARN de transfert (ARNt) et la biosynthèse de la thiamine via TusA et ThiI. IscS interagit avec ces trois protéines mais aussi avec CyaY et IscX qui fait partie de l'opéron *isc* mais dont le rôle reste encore mal connu. L'équipe de Miroslaw Cygler a établi un modèle des zones d'interaction entre le dimère d'IscS et ces partenaires : IscU, TusA, ThiI, CyaY et IscX (Shi & al, 2010). Il est intéressant de noter que le site de fixation d'IscU (**zone bleu clair**) chevauche le site de fixation de ThiI (**zone rouge**) mais pas celui de TusA (**zone jaune**) (**Figure 87**). Cependant, les sites de fixation de TusA et ThiI se chevauchent. Étonnamment, les sites de fixation de CyaY et IscX (**zone verte**) sont identiques et chevauchent celui de ThiI. L'objectif de cette partie a été d'évaluer si CyaY ou IscX ont un rôle dans la distribution du persulfure d'IscS à TusA et ThiI.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

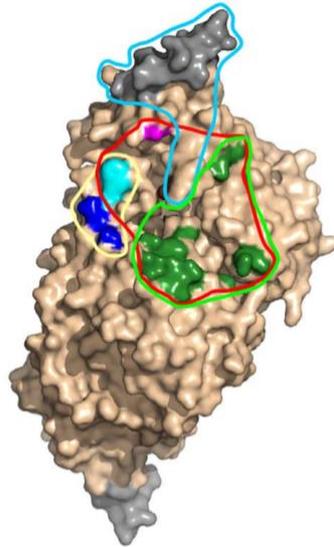


Figure 87 Modèle des zones d'interaction entre le dimère d'IscS et ses partenaires IScU, TusA, ThiI, CyaY et IscX. Les zones d'interactions d'IscU, TusA, ThiI, CyaY et IscX sont délimitées en bleu, jaune, rouge et vert respectivement. (Issue de Shi & al, 2010).

1.8.1 Effet de TusA

Nous avons ainsi mis en compétition IScU et TusA en regardant dans un premier temps si la formation de centres Fe-S était impactée par la présence de TusA. Pour cela, 100 μM de Fe-IsCU ont été incubée avec 10 μM IscS, 5 μM Fdx et FdxR, 200 μM NADPH, 100 μM de TusA en présence ou absence de 10 μM CyaY. Les réactions ont été initiées par l'ajout de 100 μM de L-cystéine. Les cinétiques d'assemblage montrent qu'en présence de TusA, la synthèse de centres Fe-S est totalement inhibée et CyaY n'est pas capable d'empêcher cette inhibition (**Figure 88a**). Nous avons dans un second temps regardé la distribution du persulfure d'IscS entre IScU et TusA par la méthode d'alkylation ARBS. TusA possède 2 résidus cystéines et donc 3 états d'alkylation, dénommés TusA +2, +1 et +0. Nous avons donc incubé 1 équivalent d'IscS, IScU et TusA en présence de 2 équivalents de L-cystéine. En absence de CyaY, la forme réduite de TusA disparaît au profit d'une espèce ayant perdu 1 unité d'alkylation pouvant correspondre à un persulfure (**Figure 88b**). Cependant, l'analyse en conditions non réductrices montre l'absence des espèces TusA+3 et +2, mais une bande aux alentours de 70 kDa correspondant à un complexe entre IscS et TusA via un pont disulfure intermoléculaire (**Figure 88c**). Cette espèce étant présente uniquement après incubation avec la L-cystéine, elle est très probablement formée par réaction entre une cystéine réduite et un persulfure porté soit par IscS, soit par TusA. Il est donc difficile de conclure si TusA a été persulfurée au cours de la réaction, mais il semble qu'il y ait une interaction privilégiée entre IscS et TusA car IScU n'est pas persulfurée au cours de cette réaction (**Figure 88a**). La présence de CyaY ne permet pas non plus d'orienter la réaction vers IScU (**Figure 88d**). Il semble donc que CyaY n'ait pas d'effet sur la distribution du soufre entre TusA et IScU.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

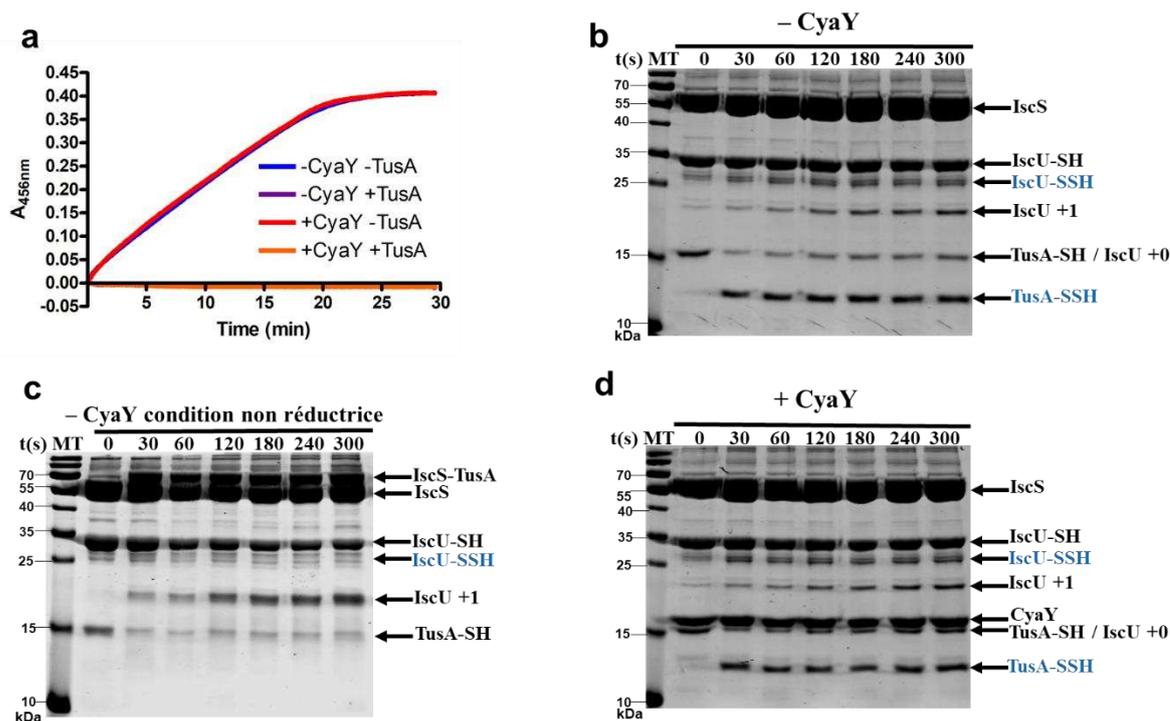


Figure 88 Compétition de transfert du persulfure d'IscS vers Fe-IscU ou TusA. (a) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm en présence ou absence de CyaY et de TusA. (b-c-d) Persulfidation de TusA et de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et de 2 équivalents de L-cystéine en absence (b-c) ou présence (d) de CyaY. Les échantillons de ces alkylations supplémentés (b-d) ou non (c) par du β -mercaptoéthanol sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser TusA et Fe-IscU.

Nous avons ensuite testé deux mutants de TusA dans la compétition de transfert de persulfure avec IscU. Le premier est muté au niveau de la cystéine catalytique de TusA qui a été caractérisée comme résidu accepteur du persulfure d'IscS (Ikeuchi & al, 2006). Cette cystéine a été mutée par une sérine, conduisant au mutant TusA C19S. Nous avons dans un premier temps évalué l'effet de ce mutant sur une cinétique d'assemblage de centres Fe-S. En présence du mutant TusA C19S la formation de centres Fe-S n'est pas inhibée et présente une vitesse et un niveau de centres Fe-S similaire à la cinétique contrôle sans ce mutant (**Figure 89a**). Nous avons également évalué la distribution de persulfure entre IscU et TusA C19S par la méthode ARBS. Nous pouvons observer qu'IscS transfère son persulfure à IscU en moins de 2 minutes (**Figure 89b**). La cystéine C19S de TusA est donc nécessaire pour interagir avec IscS par le biais de sa cystéine persulfurée. Ces résultats montrent également que l'action de TusA n'est pas d'ordre stérique, car IscU est capable de recevoir un persulfure même en sa présence.

Le second mutant de TusA concerne sa seconde cystéine Cys56 qui a été substituée par une alanine. Nous avons dans un premier temps évalué l'effet de ce mutant sur une cinétique d'assemblage de centres Fe-S dans les mêmes conditions que précédemment. La vitesse initiale de formation des centres Fe-S avec le mutant TusA C56A est similaire à la vitesse initiale en absence de ce mutant (**Figure 89c**).

Dépendance en frataxine des machineries ISC

Cependant, la vitesse d'assemblage diminue fortement lorsque 50 % des centres Fe-S sont formés et n'atteint pas le même plateau. Ce résultat suggère que la compétition entre TusA et IscU pour le persulfure d'IscS est altérée dans ce mutant. Nous avons donc regardé la distribution du persulfure d'IscS entre ces deux protéines par la méthode ARBS. En présence du mutant TusA C56A, IscU ne reçoit que 50 % de persulfure d'IscS et le mutant TusA C56A les 50 % restant (**Figure 89d**). Ce résidu Cys56 semble donc être important dans l'interaction entre la cystéine réceptrice de TusA et la cystéine catalytique d'IscS.

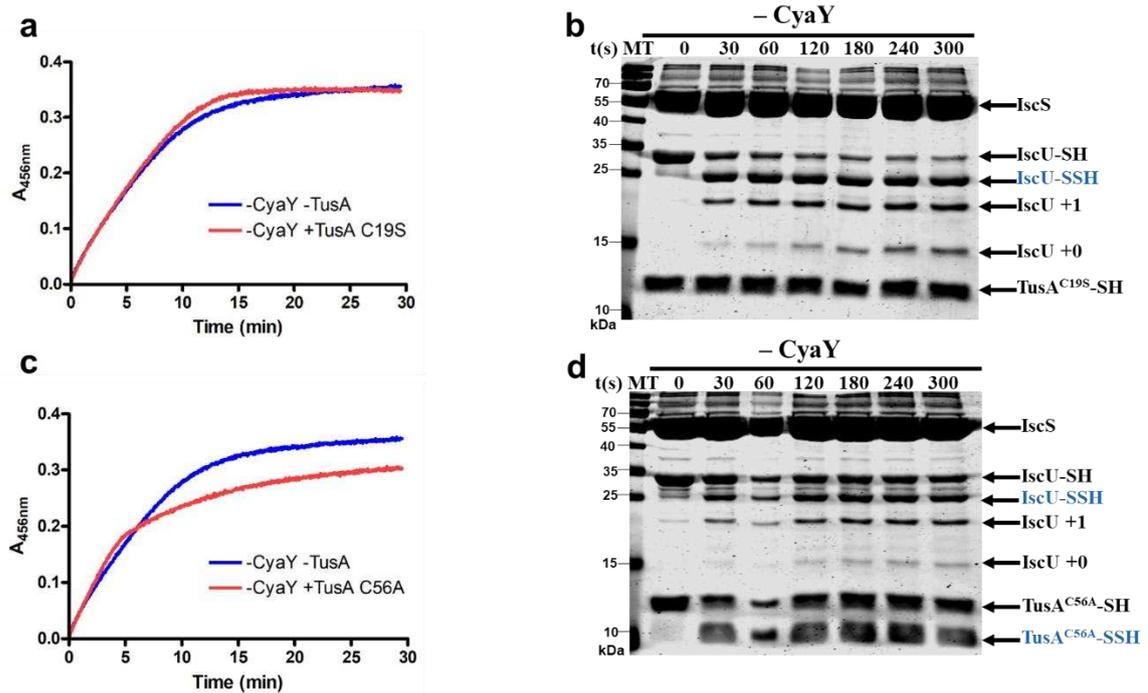


Figure 89 Compétition de transfert du persulfure d'IscS vers Fe-IscU ou TusA C19S et TusA C56A. (a) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm en présence ou absence de TusA C19S. (b) Persulfidation de TusA C19S et de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et de L-cystéine en absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser TusA C19S et Fe-IscU. (c) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques suivies à 456 nm en présence ou absence de TusA C56A. (d) Persulfidation de TusA C56A et de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et de L-cystéine en absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser TusA C56A et Fe-IscU.

1.8.2 Effet d'IscX

Nous avons par la suite testé l'effet d'IscX sur cette compétition de transfert de persulfure entre IscS et ses partenaires IscU et TusA. Nous avons également testé si IscX et CyaY devaient être en tandem afin d'observer un effet sur ce transfert de persulfure. En présence de IscX, le persulfure de IscS est

Dépendance en frataxine des machineries ISC

toujours transféré à TusA et pas à IscU (**Figure 90a**). Lorsque CyaY et IscX sont présentes toutes les deux, on observe un effet similaire (**Figure 90b**).

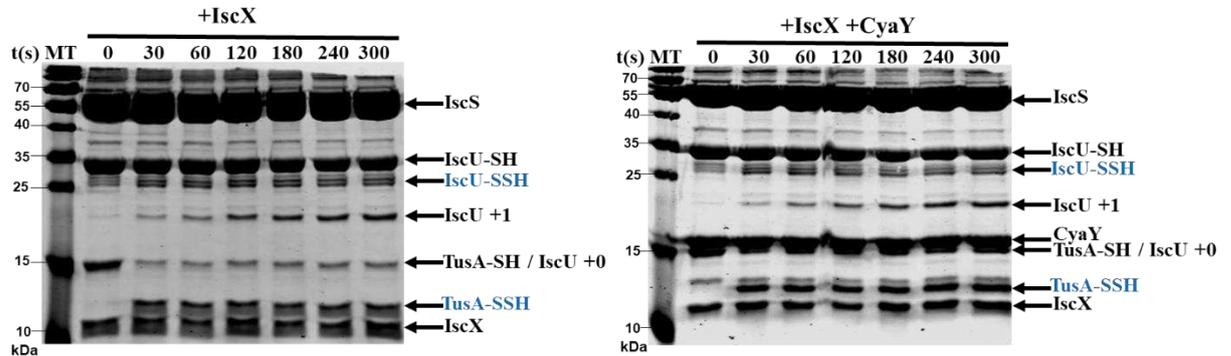


Figure 90 Effet de IscX sur le transfert de persulfure d'IscS vers Fe-IscU et TusA. Persulfidation de TusA et de Fe-IscU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et d'IscX supplémenté par 2 équivalents de L-cystéine en absence (**gel de gauche**) ou présence (**gel de droite**) de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser TusA et Fe-IscU.

En conclusion, ni CyaY, ni IscX, ni le tandem CyaY + IscX ne sont capables de détourner le transfert du persulfure d'IscS à TusA vers IscU. Cependant, nous n'avons pas eu l'occasion de tester ThiI et nous n'excluons pas un effet de CyaY pour favoriser le transfert vers IscU au dépens de ThiI, car les sites de fixation de ThiI, IscU et CyaY se chevauchent. A l'inverse, les sites de fixations de TusA et IscU sont disjoints, il n'y a donc pas à priori de compétition pour la fixation à IscS mais uniquement pour le transfert de persulfure. En se fixant au complexe IscS-IscU, CyaY pourrait potentiellement favoriser la fixation d'IscU au détriment de ThiI et donc la distribution du soufre entre ces deux protéines.

2. Une coévolution entre ISCU et la FXN a permis de rendre la machinerie ISC eucaryote dépendante de la FXN.

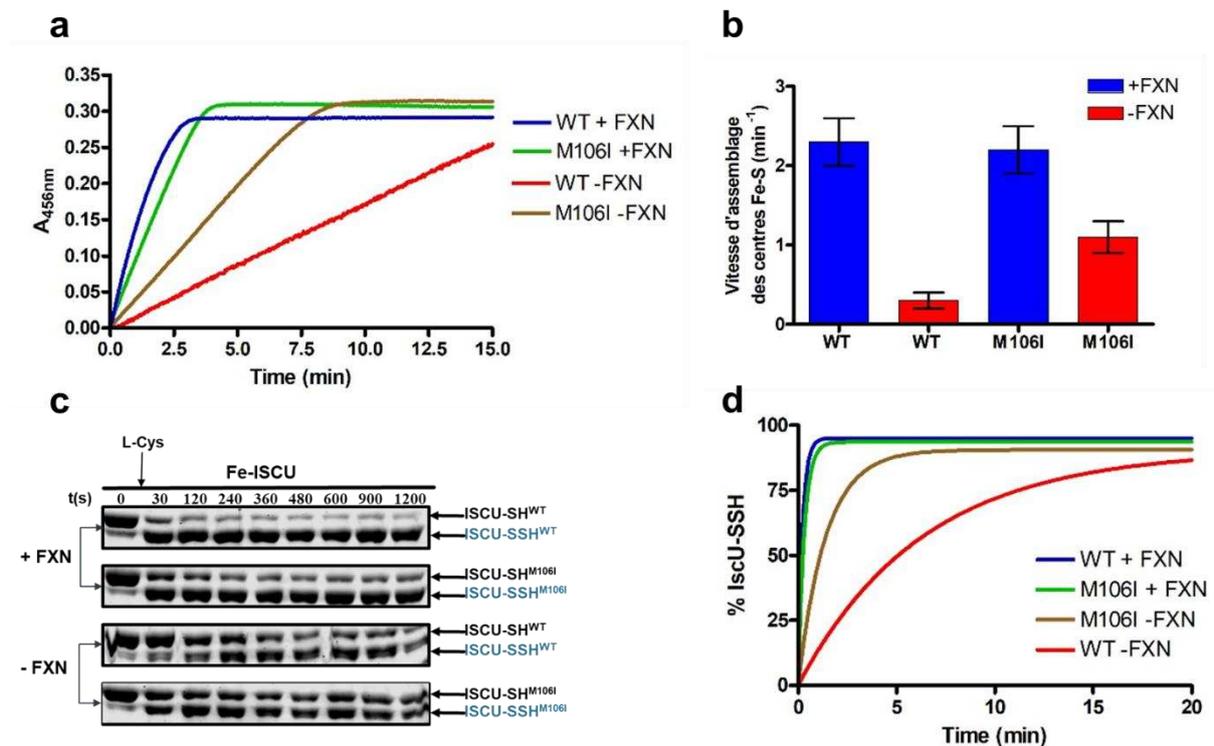
2.1 Contexte de l'étude

Alors que les protéines de la machinerie ISC ont été conservées au cours de l'évolution (75 % d'identité de séquence entre IscU/ISCU ; 60 % entre IscS/NFS1 et 25 % entre CyaY/FXN avec 70 % de similitude) ainsi que les premières étapes du mécanisme d'assemblage d'après nos données, la dépendance vis-à-vis de la frataxine semble avoir largement évolué entre procaryotes et eucaryotes. Alors que l'absence de frataxine conduit à un retard de croissance très marqué dans le modèle levure et est létale chez les eucaryotes supérieurs, son absence ne produit pas de phénotype de croissance dans le modèle bactérien *E. coli*, uniquement une capacité réduite de croissance dans des conditions de compétition avec un organisme sauvage. Ces différences semblent corrélées à la sévérité des défauts d'assemblage des centres Fe-S avec des diminutions de l'ordre de 90 % chez les eucaryotes et de l'ordre de 50 % chez *E. coli* (Rötig & al, 1997 ; Roche & al, 2015). Il semble donc que l'importance ou le rôle de la frataxine dans l'assemblage des centres Fe-S ait évolué. L'étude de la machinerie ISC eucaryote de *M. musculus* nous a permis de mettre en avant que la frataxine est un activateur cinétique de l'assemblage accélérant le transfert de soufre à ISCU (**article#2**). En 2011, l'équipe du Dr. Andrew Dancis a identifié un mutant ponctuel dans IscU capable de restaurer la croissance de souches de levure ne possédant pas de frataxine, corrélé à une amélioration de l'activité de biogénèse des centres Fe-S (Yoon & al, 2015). Ce mutant cible la position 106 (numérotation protéine *M. musculus*) en remplaçant une méthionine par une isoleucine (Roche & al, 2015, Yoon & al, 2015). L'équipe de Béatrice Py/Frédéric Barras, a ensuite montré par comparaison de séquences d'IscU qu'une méthionine est présente en position 106 dans tous les organismes eucaryotes et un résidu hydrophobe (Ile, Leu, Val) ou plus rarement une asparagine (Asn) chez les procaryotes et notamment un très grand nombre de bactéries. Ce groupe a alors montré qu'en « eucaryotisant » IscU d'*E. coli*, par la mutation du résidu Ile106 en méthionine, cet organisme devient plus dépendant de la frataxine, avec un phénotype de retard de croissance et une forte diminution de l'activité de biosynthèse des centres Fe-S en son absence (Roche & al, 2015). Il est intéressant d'observer qu'une seule mutation dans IscU est capable de rendre la machinerie ISC plus ou moins dépendante de la frataxine. Nous avons donc étudié l'effet de cette mutation dans les protéines ISCU souris et IscU d'*E. coli* afin de déterminer le mécanisme de dépendance en frataxine.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

2.2 Effet de la mutation d'ISCU M106I sur la machinerie ISC eucaryote

Nous avons commencé par évaluer l'effet de la mutation M106I dans ISCU souris sur l'assemblage de centres Fe-S avec le système reconstitué complet (**Figure 91a**). En absence de FXN, l'assemblage est accéléré avec le mutant M106I, d'un facteur 4 environ par rapport à la protéine sauvage, avec des vitesses de $1,1 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ pour le mutant M106I et $0,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ pour la protéine WT (**Figure 91a,b**). En présence de FXN, les vitesses d'assemblage sont sensiblement équivalentes. Pour déterminer si la mutation agit sur le transfert de persulfure comme FXN, nous avons étudié les cinétiques de transfert par la méthode ARBS. Nous pouvons observer qu'en absence de FXN, le transfert de persulfure est plus rapide avec le mutant M106I que ISCU sauvage, avec des vitesses respectives de l'ordre de $0,9 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ et $0,2 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 91c,d,e**). La substitution M106I permet donc d'accélérer le transfert de persulfure en absence de FXN, ce qui a pour conséquence de stimuler l'assemblage, mais pas autant que FXN. Cette mutation semble donc mimer, mais seulement partiellement, l'effet de FXN sur le transfert de persulfure à ISCU. De plus, FXN est toujours capable d'accélérer le transfert de persulfure dans ce mutant, ce qui confirme que la mutation ne reproduit que partiellement l'effet de FXN et donc que d'autres facteurs interviennent pour l'accélération de ce processus.



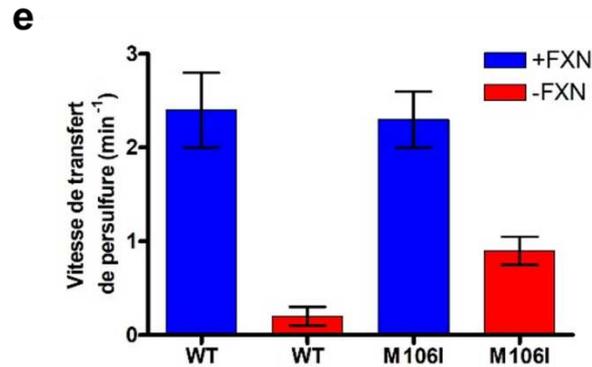


Figure 91 Effet du mutant ISCUM106I sur l'assemblage des centres Fe-S. **(a)** Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques avec Fe-ISCU et Fe-ISCU M106I suivies à 456 nm en présence ou absence de FXN. **(b)** Vitesse d'assemblage des centres Fe-S d'ISCU WT ou M106I en présence (bleu) ou absence de FXN (rouge). **(c)** Persulfidation d'ISCU et d'ISCU M106I suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent de complexe NIA et de L-cystéine en présence ou absence de FXN. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser ISCU. **(d)** Quantification de la forme persulfurée d'ISCU à partir des gels SDS-PAGE **(c)**. **(e)** Vitesse de transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU WT ou M106I en présence (bleu) ou absence (rouge) de FXN.

2.3 Effet de la mutation d'IscU I106M sur la machinerie ISC procaryote

Nous avons ensuite évalué l'effet de la mutation I106M dans IscU d'*E. coli*. En absence de CyaY, nous pouvons observer que la vitesse de transfert de persulfure avec le mutant IscU I106M est fortement réduite, d'un facteur environ 8, par rapport à IscU sauvage (**Figure 92a,b,c**). La présence d'un résidu méthionine en position 106 à la place d'une isoleucine a donc un effet ralentisseur sur la vitesse de transfert de persulfure chez les procaryotes comme chez les eucaryotes. De plus, en présence de CyaY, la vitesse de transfert de persulfure est augmentée d'un facteur 2, ce qui suggère un rôle conservé d'accélérateur de transfert entre les frataxines de différents organismes (**Figure 92a,b,c**).

Dépendance en frataxine des machineries ISC

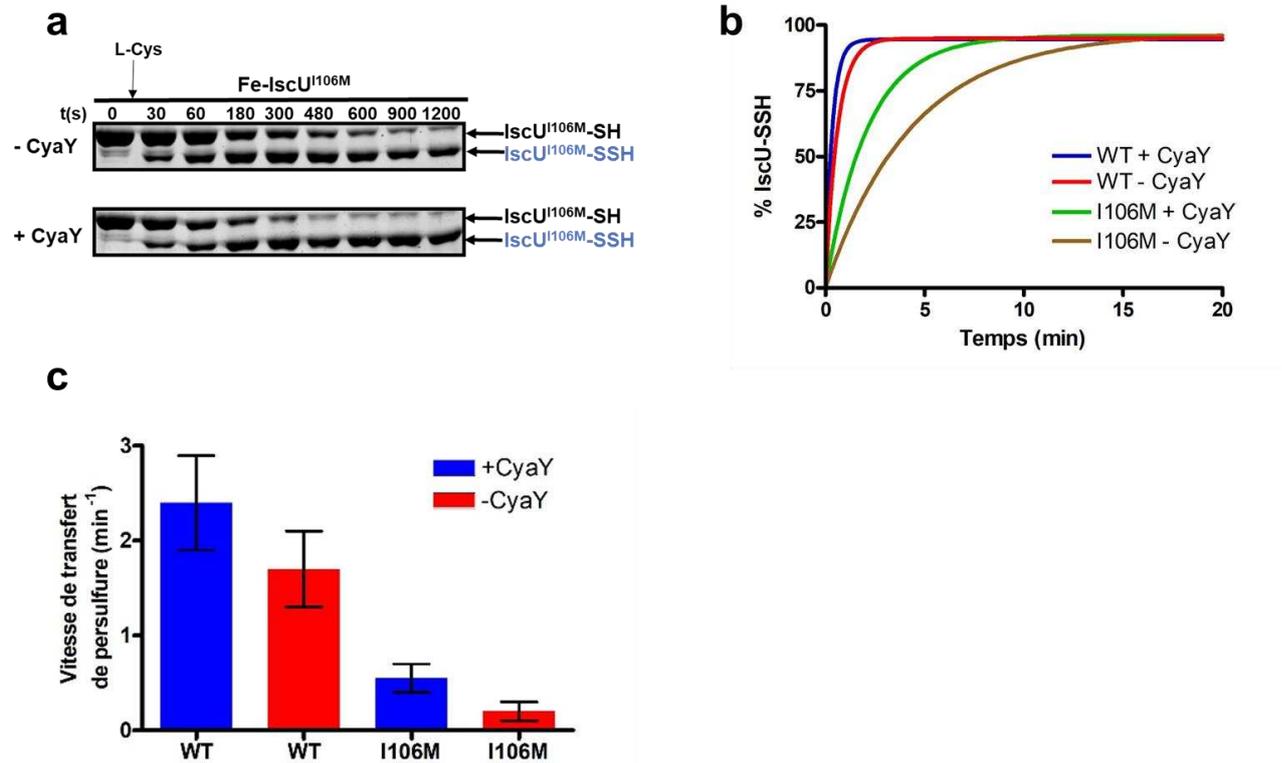


Figure 92 Effet du mutant IscU I106M sur le transfert de persulfure. (a) Persulfidation d'IscU I106M suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent d'IscS et de L-cystéine en présence ou absence de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser IscU. (b) Quantification de la forme persulfurée d'IscU I106M à partir des gels SDS-PAGE (a). (c) Vitesse de transfert de persulfure entre IscS et IscU WT ou I106M en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

Nous avons ensuite étudié l'effet de cette mutation sur l'assemblage de centres Fe-S. En absence de CyaY, la vitesse globale d'assemblage avec le mutant I106M d'IscU est ralentie d'un facteur 2 environ en passant de $1,9 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ à $0,9 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$, ce qui est compatible avec la diminution de la vitesse de transfert de persulfure (**Figure 93** courbe rouge et bleue). Ces données semblent donc cohérentes avec les observations *in vivo* montrant un défaut d'assemblage de l'ordre de 30 à 50 % dans des cellules exprimant le mutant I106M (Roche & al, 2015). Cependant, en présence de CyaY, nous avons observé que la vitesse globale d'assemblage par le mutant I106M est encore plus réduite passant de $0,9 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ à $0,2 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 93** courbe verte). CyaY semble donc inhiber la formation de centres Fe-S avec ce mutant, ce qui n'est pas cohérent avec les données *in vivo* montrant une récupération du défaut de croissance et d'assemblage de centres Fe-S par CyaY (Roche & al, 2015). Le fait que CyaY soit capable d'accélérer le transfert de persulfure mais ralentisse l'assemblage, suggère qu'elle intervient à une autre étape du processus, en plus du transfert. Nous avons émis l'hypothèse que CyaY a une affinité plus forte pour le mutant I106M que pour le WT, ralentissant ainsi sa dissociation d'IscS et donc sa dimérisation pour former le centre binucléaire [2Fe2S].

Dépendance en frataxine des machineries ISC

Nous nous sommes alors demandé si la protéine IscX qui se lie à IscS sur le même site de fixation que CyaY pourrait jouer un rôle à cette étape. En présence de IscX à 1 équivalent par rapport à IscS, la vitesse globale d'assemblage est augmentée, mais sans atteindre la vitesse observée en absence de CyaY (**Figure 93 courbe orange**). Ces résultats suggèrent donc qu'IscX limite l'effet inhibiteur de CyaY, potentiellement en déplaçant CyaY du complexe IscS-IscU. Il serait intéressant de réaliser une titration d'IscX en présence de CyaY pour voir si à de plus hautes concentrations, il est possible d'obtenir une vitesse d'assemblage plus grande que celle obtenue sans CyaY. Ces résultats suggèrent donc qu'IscX pourrait être importante *in vivo* pour permettre la récupération des phénotypes associés au mutant I106M.

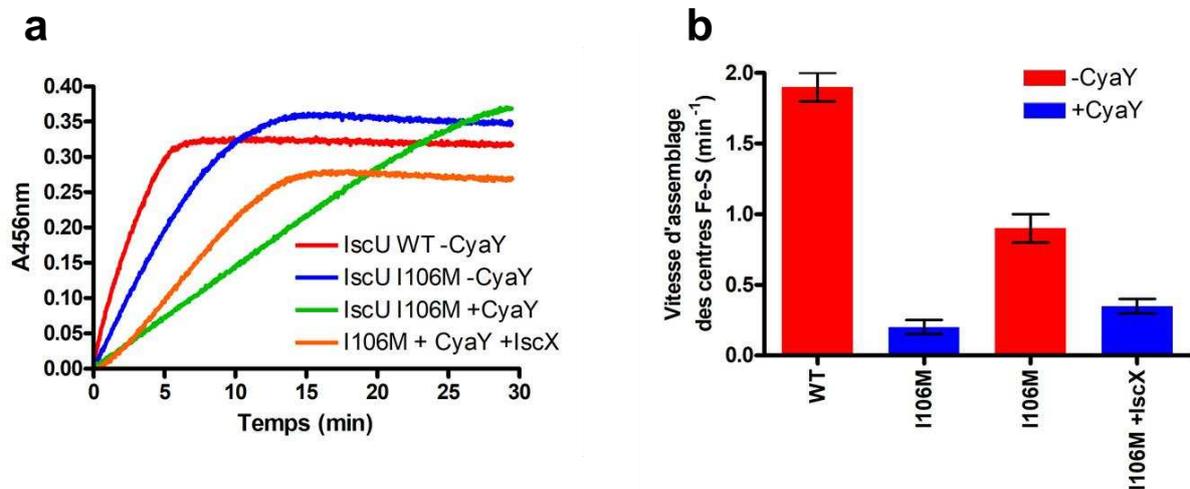


Figure 93 Effet du mutant IscU I106M sur l'assemblage des centres Fe-S. (a) Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques avec IscU sauvage ou IscU I106M suivies à 456 nm avec le couple Fdx/FdxR en présence ou absence de CyaY et de IscX. (b) Vitesse d'assemblage des centres Fe-S avec IscU WT ou I106M en présence (bleu) ou absence (rouge) de CyaY.

2.4 Effet de CyaY sur la machinerie ISC eucaryote

Enfin, nous nous sommes demandé si CyaY pourrait remplacer FXN dans le système souris (**Figure 94**). Nous avons constaté que la vitesse globale d'assemblage (**Figure 94a,b**), ainsi que la vitesse de transfert de persulfure (**Figure 94c,d,e**) dans le système ISC murin (ISCU, NFS1-ISD11-ACP, FDX2, FDXR) sont toutes deux augmentées d'un facteur environ 2,5 en présence de CyaY. La frataxine bactérienne est donc en capacité d'accélérer le transfert de persulfure dans la machinerie eucaryote renforçant l'idée que cette fonction a été conservée entre organismes. Néanmoins, CyaY n'est pas capable d'atteindre le niveau d'accélération de FXN eucaryote, ce qui suggère un gain de fonction par FXN au cours de l'évolution.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

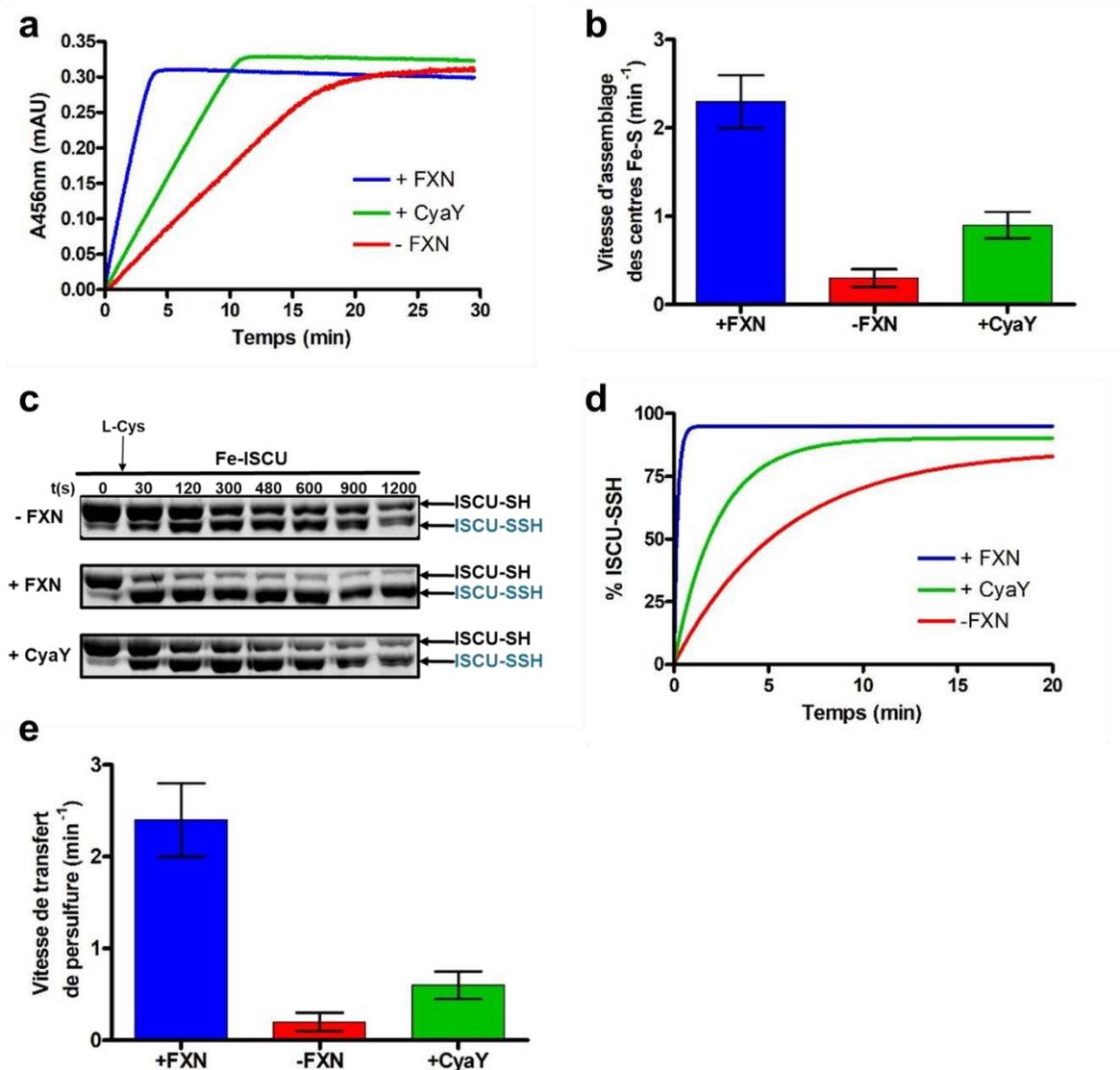


Figure 94 Effet de CyaY sur l'assemblage des centres Fe-S par la machinerie eucaryote. **(a)** Cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques avec Fe-ISCU suivies à 456 nm en présence ou absence de FXN et de CyaY. **(b)** Vitesse d'assemblage des centres Fe-S avec ISCU WT en présence (bleu) ou absence (rouge) de FXN et en présence (vert) de CyaY. **(c)** Persulfidation d'ISCU suivie par la méthode ARBS en présence de 1 équivalent de complexe NIAU et de L-cystéine en présence ou absence de FXN et de CyaY. Les échantillons de ces alkylations sont déposés sur un gel SDS-PAGE 14 % pour visualiser ISCU. **(d)** Quantification de la forme persulfurée d'ISCU à partir des gels SDS-PAGE **(c)**. **(e)** Vitesse de transfert de persulfure avec ISCU WT en présence (bleu) ou absence (rouge) de FXN et en présence (vert) de CyaY.

3. Discussion

L'étude de l'effet de CyaY sur la cinétique d'assemblage Fdx-dépendante nous a montré qu'elle n'avait pas d'effet accélérateur comme celui mis en évidence avec la frataxine eucaryote, uniquement un effet inhibiteur sur la réaction thiol-dépendante cohérent avec les reconstitutions DTT-dépendante mais qui ne représente pas un processus physiologiquement pertinent. Cependant, les cinétiques d'assemblage Fdx-dépendantes ont mis en évidence un effet de CyaY en présence de fer libre qui pourrait être compatible avec l'effet fer-dépendant de CyaY *in vivo* (Roche & al, 2015). Nous avons trouvé de manière étonnante que le fer libre interfère avec la réaction d'assemblage et que CyaY limite cet effet pour une certaine gamme de concentrations en fer (ratio fer : IscS-IscU compris entre 50:1 et 200:1).

L'étude de l'effet du fer étape par étape nous a montré que le fer n'agit ni sur la formation du persulfure d'IscS, ni sur son transfert à IscU, mais sur sa réduction. Nos données suggèrent que le fer altère la réduction par Fdx. Il semble également que le fer libre soit capable de réduire de manière non-spécifique et Fdx-dépendante les persulfures aussi bien dans IscS que dans IscU. De plus, en conditions stœchiométriques où la réaction est bloquée au stade de l'intermédiaire (IscS-IscU-[1Fe1S])₂, le fer induit la formation de centre Fe-S, mais la RMN suggère qu'IscU ne se dissocie pas d'IscS et l'analyse du produit final après dessalage indique que ces centres Fe-S ne sont pas liés à une protéine. De même, les cinétiques d'assemblage en conditions catalytiques indiquent que la quantité de centre Fe-S est équivalente quelle que soit la concentration en fer libre, ce qui pourrait suggérer que cette réaction est productive de centres [2Fe2S] dans IscU. Cependant nous n'avons pas réalisé d'analyse du produit final à l'issue des réactions d'assemblage pour vérifier que les centres Fe-S étaient effectivement liés à IscU. Au final, il semble que le fer interfère avec la réduction par Fdx et le fait que cette étape soit la plus lente du processus d'assemblage renforce l'idée que cette interférence aura un effet sur la vitesse globale d'assemblage.

L'étude de l'effet de CyaY à chaque étape, en présence de fer, nous a montré que CyaY n'agit pas sur la formation du persulfure d'IscS, mais semble accélérer la réaction de transfert de persulfure, probablement en stabilisant le fer au sein du complexe IscS-IscU. Cependant, cet effet ne permet pas d'expliquer son effet accélérateur ou protecteur en présence de fer libre, puisque le fer libre n'a pas d'effet inhibiteur sur le transfert. Nous avons également observé un effet ralentisseur de CyaY sur la réduction par Fdx en absence de fer, mais qui ne permet pas non plus d'expliquer son effet protecteur car l'effet est ici ralentisseur. Cet effet ralentisseur pourrait être dû à une compétition entre CyaY et Fdx pour la fixation au complexe IscS-IscU. Par contre, nous avons observé que pour des ratios de Fe²⁺/IscS-IscU compris entre 5:1 et 100:1, CyaY ralentit la réduction du persulfure d'IscS. A plus forte concentration en fer, CyaY n'a plus d'effet. L'ensemble de ces données suggèrent que CyaY protège le complexe IscS-IscU contre l'effet délétère du fer sur la réduction non-spécifique de persulfure. Cet effet

Dépendance en frataxine des machineries ISC

protecteur contre le fer libre pourrait potentiellement expliquer l'effet positif de CyaY sur l'assemblage en conditions riches en fer. Cependant, l'effet protecteur de CyaY sur la réduction non-spécifique est observé à des ratios en fer plus faible que dans les réactions d'assemblage. Néanmoins, les conditions expérimentales sont différentes, notamment la présence d'une plus grande quantité d'IscU dans les réactions d'assemblage, va permettre de tamponner le fer en excès et également d'engager l'intermédiaire [1Fe1S] dans la formation de centres [2Fe2S], tandis que dans les réactions de réduction suivie par test ARBS, le système est bloqué au niveau de cet intermédiaire. L'hypothèse que le fer soit toxique pour l'assemblage des centres Fe-S reste surprenante et ne semble pas cohérente avec le fait qu'*in vivo*, en conditions riches en fer, l'activité de biogénèse est globalement plus élevée. Il est possible qu'en conditions pauvres (M9), le fer soit limitant et donc l'activité de biogénèse ne serait pas optimale, alors qu'en conditions riches l'activité de biogénèse serait à son maximum mais serait également ralentie par la présence de fer libre. Pour répondre à cette question il faudrait tester des gammes de concentrations en fer *in vivo*.

Nous avons également exploré l'hypothèse que CyaY orchestre la distribution du persulfure d'IscS entre IscU et TusA, ce qui pourrait également expliquer son effet sur l'assemblage des centres Fe-S si elle était capable de favoriser IscU vis-à-vis de TusA. Nous avons en parallèle testé l'effet de IscX. Nous avons montré que TusA est favorisée par rapport à IscU et que, ni CyaY, ni IscX ne pouvait rediriger le soufre vers IscU. L'absence de compétition entre IscU et TusA peut s'expliquer par le fait que leurs zones d'interactions avec IscS sont disjointes. Il semble donc que CyaY ne soit pas impliquée dans la distribution du soufre entre TusA et IscU. Cependant, nous n'avons pas étudié l'effet de CyaY et IscX sur la distribution entre ThiI et IscU car leurs sites de fixation respectifs sur IscS se chevauchent, ce qui pourrait conduire à une compétition entre les deux protéines.

Enfin, nous avons cherché à comprendre comment les machineries ISC eucaryotes et procaryotes qui sont pourtant extrêmement similaires pouvaient être plus au moins dépendantes de la frataxine. Nous avons observé chez les eucaryotes que l'étape limitante était le transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU, à l'inverse chez les procaryotes cette étape est très rapide et c'est l'étape de réduction qui devient l'étape la plus lente sans pour autant devenir totalement déterminante cinétiquement car très proche de la vitesse de transfert de persulfure. Chez les eucaryotes, le transfert est stimulé par la frataxine par un facteur environ 10 ce qui permet d'accélérer l'assemblage. Nous avons constaté que le ralentissement de la vitesse de transfert entre les procaryotes et les eucaryotes était dû à la mutation du résidu en position 106 qui détermine également la dépendance en frataxine *in vivo*. Chez les eucaryotes ce résidu est une méthionine alors que chez les procaryotes c'est soit une isoleucine, une leucine ou une valine et dans de rares cas une asparagine. La substitution de la méthionine 106 par une isoleucine dans la protéine ISCU de souris conduit à une accélération du transfert corrélée à une stimulation de l'assemblage des centres Fe-S. Bien que cette mutation ne reproduise que partiellement l'effet de FXN, il semble qu'*in vivo* cela soit suffisant pour récupérer le défaut de croissance.

Dépendance en frataxine des machineries ISC

Inversement, la substitution de l'isoleucine en méthionine à la position 106 équivalente chez IscU d'*E. coli*, conduit à un ralentissement de la réaction de transfert et à une accélération en présence de CyaY. L'effet de la mutation I106M sur le transfert est corrélé à un effet ralentisseur sur l'assemblage mais relativement modeste car la réduction reste limitante. Il est difficile de dire si cet effet modeste peut à lui seul expliquer l'effet observé *in vivo*. Il est donc possible que ce mutant induise d'autres effets qui affectent l'assemblage. Notamment, une interaction plus faible entre IscS et IscU ou une sensibilité accrue au fer. De plus, CyaY ralentit fortement la réaction d'assemblage alors qu'elle accélère le transfert de persulfure. Cela nous a amené à émettre l'hypothèse que CyaY interagit plus fortement avec le mutant I106M, ce qui pourrait interférer avec la réduction du persulfure ou la dimérisation. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'IscX limite l'effet inhibiteur de CyaY. Bien que dans nos conditions, IscX ne permette pas d'obtenir une accélération de l'assemblage par CyaY avec le mutant I106M par rapport à la réaction effectuée sans elle, il est possible qu'à des concentrations plus élevées en IscX cela soit le cas. Il faudrait donc tester une gamme de concentrations en IscX pour pouvoir conclure.

Au final, ces résultats montrent l'importance du résidu en position 106 dans le transfert de persulfure. Ce résidu se trouve à proximité du site métallique d'IscU sur la même hélice α que la cystéine 104 acceptrice du persulfure. La mutation de la méthionine par une isoleucine peut potentiellement augmenter la flexibilité de cette hélice α permettant ainsi une acquisition plus aisée du persulfure par la cystéine 104. Mais il reste encore difficile de comprendre comment la substitution d'une méthionine par un acide aminé hydrophobe peut modifier cette flexibilité, car cette position est très exposée au solvant et semble peu impliquée dans la structuration de la protéine. Un certain nombre d'acides aminés hydrophobes à proximité (Leu97, Leu102, Leu107) pourrait jouer un rôle dans ce processus mais cela reste à établir.

Nous avons également évalué l'effet de CyaY sur la machinerie eucaryote afin de déterminer si la frataxine bactérienne aurait le potentiel d'accélérer l'assemblage des centres Fe-S. Nous avons observé qu'en présence de CyaY, le transfert de persulfure est augmenté d'un facteur 3 ainsi que l'assemblage. CyaY a donc le potentiel d'activer le transfert de persulfure dans la machinerie eucaryote tout en restant moins efficace que FXN. Cela peut s'expliquer par le fait que la frataxine eucaryote ait évolué en acquérant des mutations ponctuelles pour améliorer sa capacité à stimuler le transfert de persulfure. La structure du complexe NIAUF parue en 2019, a permis de mettre en évidence un certain nombre de modifications structurales induites par FXN dans ISCU (**Figure 95**). L'une des interactions qui semble centrale dans le mécanisme d'activation par FXN est une interaction d'empilement π - π entre le résidu ligand du fer d'ISCU His103 avec le Trp155 de FXN. Cet acide aminé est conservé parmi les frataxines montrant ainsi son rôle critique dans le processus d'assemblage des centres Fe-S. Par contre, au moins deux acides aminés polaires qui semblent importants pour le mécanisme d'activation par FXN n'étaient pas initialement présents dans CyaY, on trouve à la place des acides aminés hydrophobes à ces

Dépendance en frataxine des machineries ISC

positions. C'est le cas de l'asparagine Asn151 qui interagit avec la cystéine Cys35 qui coordonne le fer et la sérine Ser157 qui interagit avec la proline Pro99 dans ISCU pour favoriser la torsion de l'hélice α portant l'histidine His103 et la cystéine Cys104. À ces positions, CyaY possède une leucine et une alanine. Il serait donc intéressant de tester les mutants L151N et A157S dans CyaY. Au final, ces données suggèrent que non seulement ISCU mais également la frataxine, ont évolué pour rendre le processus d'assemblage plus dépendant de la frataxine.

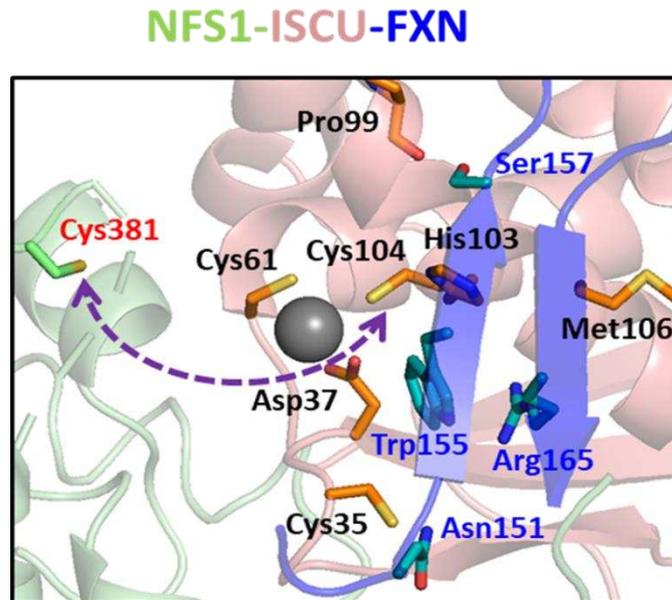


Figure 95 Interaction de la FXN avec ISCU. Structure du complexe humain NIAUF résolue par microscopie électronique (code PDB : 6nzu). Zoom des régions d'interactions entre la FXN et le premier monomère de NFS1 et ISCU.

Chapitre 7 Conclusions et Perspectives

La compréhension des mécanismes d'assemblage des centres Fe-S par les machineries ISC eucaryote et procaryote a été le principal travail de ma thèse. Nous sommes parvenus à reconstituer ces machineries à partir des protéines préalablement purifiées, nous permettant ainsi de réaliser des études détaillées des mécanismes. Nous avons pu constater que les principales étapes du mécanisme d'assemblage sont conservées entre eucaryote et procaryote avec cependant des différences importantes pour le processus de dimérisation conduisant à la formation du centre [2Fe2S].

En résumé, nous pouvons proposer un mécanisme général, aussi bien pour le système eucaryote que procaryote, en cinq étapes principales :

- 1) Un ion fer ferreux (Fe^{2+}) est inséré dans ISCU/IscU. Ce fer ferreux proviendrait du pool de fer labile.
- 2) Un atome de soufre est ensuite inséré sous la forme d'un persulfure fourni par la cystéine désulfurase NFS1/IscS via la formation d'un complexe hétéro-dimérique entre les deux protéines.
- 3) La ferrédoxine FDX2/Fdx réduit le persulfure d'ISCU/IscU, ce qui conduit à la formation d'un ion sulfure qui reste fixé au fer sous la forme d'un intermédiaire Fe-SH (ou [1Fe1S]).
- 4) Deux ISCU/IscU portant chacune un intermédiaire [1Fe1S] dimérise pour former un centre [2Fe2S] pontant par condensation des deux précurseurs [1Fe1S]. Cette dimérisation se produirait au sein du complexe NFS1-ISCU dans le système eucaryote et à partir d'IscU libre, après dissociation du complexe IscS-IscU, dans le système procaryote.
- 5) Le dimère d'ISCU/IscU se dissocie et le centre [2Fe2S] pontant est retenu par l'une des deux sous-unités, conduisant à un monomère liant un seul centre [2Fe2S]. Cette étape se produirait au sein du complexe NFS1-ISCU dans le système eucaryote, et ensuite, le monomère liant un seul centre [2Fe2S] se dissocierait de NFS1. Ce monomère peut à nouveau dimériser pour former un dimère comportant cette fois deux centres [2Fe2S]. Mais ce serait l'espèce monomérique avec un seul centre [2Fe2S] qui serait le substrat des systèmes chaperons HSPA9/HSC20 et HscA/HscB pour le transfert aux glutarédoxines.

Ces travaux ont donc permis de commencer à établir la séquence d'assemblage des centres Fe-S par la machinerie ISC. Cela nous a également permis de montrer qu'il existe une voie alternative de formation de centres Fe-S lorsqu'un thiol (DTT, L-cystéine en excès, GSH...) est utilisé comme réducteur de persulfure à la place de FDX2/Fdx, mais que cette réaction n'est pas physiologiquement pertinente car le mécanisme est très différent de celui impliquant FDX2/Fdx et la réaction beaucoup moins efficace. Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé aux mécanismes fins des différentes étapes du processus d'assemblage, pour comprendre comment les apports en fer en soufre peuvent être coordonnés pour que la réaction soit aussi efficace, avec environ 95% du soufre et du fer incorporés sous forme de centres [2Fe2S].

Conclusions et Perspectives

Nous avons donc vu que le processus d'assemblage est initié par l'insertion d'un atome de fer dans la protéine échafaudage ISCU/IscU dans son site catalytique. Nous avons mené une étude extensive de ce centre métallique par mutagenèse dirigée et par des analyses biochimiques et spectroscopiques, montrant que le fer est mononucléaire, à l'état redox Fe(II) haut-spin ($S=2$) coordonné par quatre résidus invariants : cystéine 35, cystéine 61, aspartate 37 et histidine 103 dans une géométrie tétraédrique. Les spectroscopies Mössbauer, RPE et CD ont montré que le fer s'insère dans le même site dans IscU d'*E. coli*. De plus, l'analyse par RPE indique que la cystéine 104 qui est le récepteur de persulfure se situe à proximité du fer et peut remplacer l'histidine 103 en son absence. Une configuration identique a été rapportée quand le zinc est fixé dans le site d'assemblage à la place du fer, ce qui explique probablement leurs rôles interchangeable pour le transfert de persulfure.

Nous avons constaté que le zinc, présent à l'issue de la purification d'ISCU, empêche l'insertion de fer pour initier l'assemblage des centres Fe-S. La frataxine dont un rôle de chaperonne à fer avait été proposé, ne permet pas d'échanger le zinc par le fer. Le zinc pourrait potentiellement avoir un rôle physiologique en stabilisant la forme structurée d'ISCU. Il serait donc intéressant d'évaluer directement si *in vivo*, ISCU lie du zinc. Pour cela nous pourrions réaliser des expériences d'immuno-précipitation dans des cellules humaines. S'il s'avère que du zinc est présent dans ISCU *in vivo*, il sera primordial de le retirer, potentiellement par l'action d'une métallo-chaperonne. La chaperonne HSPA9 et sa co-chaperonne HSC20 sont des candidats potentiels. En effet, ces chaperonnes ont premièrement été décrites comme étant impliquées dans le transfert du centre [2Fe2S] d'ISCU vers GLRX5, mais pourraient également intervenir dans l'échange du zinc par le fer. HSC20 lie de manière spécifique un atome de zinc renforçant ainsi notre hypothèse de l'implication de ce système co-chaperon pour retirer l'atome de zinc. Il serait donc intéressant de réaliser une cinétique d'assemblage avec Zn-IscU en présence de HSPA9 et HSC20 pour évaluer notre hypothèse. Le zinc pourrait également avoir un rôle dans la formation du composé X nécessaire à la machinerie CIA. En effet, NFS1 est capable de transférer son persulfure à ISCU en présence de zinc et FXN accélère cette réaction. De plus, en présence de zinc le persulfure dans ISCU est stable, car il ne peut pas être réduit par FDX2. Il est donc possible que la forme Zn-ISCU fonctionne comme une sulfure-transférase FXN-dépendante vers le composé X.

Nous avons observé que le transfert du persulfure de NFS1/IscS à ISCU/IscU est un processus métal-dépendant. C'est le premier transfert de persulfure décrit en biologie comme étant métal-dépendant. Cette dépendance vis-à-vis du fer permettrait de coordonner l'apport en soufre avec la présence du fer au sein d'ISCU. Le mécanisme de transfert de persulfure reste à déterminer mais il semble que le métal joue le rôle d'un acide de Lewis liant le persulfure de NFS1 pour le rendre nucléophile. La structure cristallographique de SufU de *Bacillus subtilis* dans une forme persulfurée (code PDB : 6JZW) montre que le persulfure se lie directement au zinc ce qui conforte cette hypothèse.

Conclusions et Perspectives

Nous avons également trouvé que la réduction de persulfure par FDX2/Fdx était fer-dépendante, ce qui semble être une propriété essentielle de ce type de système pour éviter la propagation des ions sulfures à l'extérieur d'ISCU/IscU et rendrait la réaction inefficace. Nos données suggèrent que FDX2/Fdx fournit un premier électron et que le second électron est fourni par l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} , ce qui conduirait à une espèce Fe(III)-SH, puis FDX2/Fdx fournirait un second électron pour obtenir une espèce Fe(II)-SH qui serait plus efficace pour se condenser en centre [2Fe2S]. Ainsi, notre hypothèse est que le persulfure d'ISCU/IscU est lié au métal avant d'être réduit et que FDX2/Fdx n'est capable que de réduire des espèces fer-persulfure. Cela permettrait donc de coupler la formation d'ions sulfures à la présence du fer dans ISCU/IscU et ainsi éviter la diffusion de ces ions une fois formés.

Enfin, nous avons montré que les machineries ISC eucaryote et procaryote forment exclusivement des centres [2Fe2S]. La biosynthèse des centres [4Fe4S] semble donc être effectuée par les protéines ISCA/IscA. À partir des titrations en fer et en soufre sur ISCU/IscU, nous avons émis l'hypothèse que la formation du centre binucléaire [2Fe2S] nécessitait une dimérisation d'ISCU/IscU. Nous n'avons pas encore caractérisé le dimère pour la machinerie eucaryote mais nous pensons que cette dimérisation est médiée par ISD11-ACP qui permettrait un changement conformationnel de NFS1 dans sa forme ouverte pour rapprocher les deux ISCU. Pour mettre en évidence cette dimérisation qui semble être une étape très rapide il serait intéressant d'utiliser des approches de cinétiques rapides. Il serait également intéressant de caractériser les deux conformations de NFS1, ouverte et fermée, en solution pour une meilleure compréhension de ce mécanisme. Nous avons en revanche mis en évidence avec la machinerie procaryote par spectrométrie de masse native la formation d'un dimère transitoire d'IscU en dehors du complexe et la formation d'un dimère d'ISCU contenant deux centres [2Fe2S]. Ce dernier dimère a été récemment cristallisé chez *Methanothrix Thermoacetophila* (Kunichika & al, 2021). Cette structure a permis de mettre en évidence que les résidus hautement conservés Tyr7, Asp40, Phe61 et Lys104 (numérotation *M. thermoacetophila*) sont essentiels à la formation du dimère d'IscU. En effet, l'interface de dimérisation montre deux interactions importantes, une interaction d'empilement π - π entre les résidus Tyr7 et Phe61 et une interaction par le biais d'une liaison hydrogène entre les résidus Asp40 (également ligand du centre [2Fe2S]) et Lys104. Pour définitivement prouver la dimérisation d'IscU au cours de la réaction, nous avons pour objectif de muter les résidus Tyr7, Phe61 et Lys104 dans IscU d'*E. coli* afin de déstabiliser le dimère pour empêcher la formation de centres Fe-S. Cependant, ces résidus sont également impliqués dans l'interaction entre IscU et IscS, il sera donc nécessaire de trouver des mutations qui préservent cette interaction tout en empêchant la formation du dimère. Cela semble possible avec la tyrosine Tyr7, en la substituant par une glutamine qui va conserver l'interaction par pont salin dans le complexe IscS-IscU mais va éliminer l'interaction d'empilement π - π des cycles aromatiques entre Tyr7 et Phe61. Pour Phe61 et Lys104 nous allons tester de muter ces résidus par des isoleucines.

Conclusions et Perspectives

Une partie très importante de mon travail de thèse a été de comprendre le rôle et le mode d'action de la frataxine chez les eucaryotes et les procaryotes. Nous avons pu montrer que FXN, la frataxine eucaryote, accélère le transfert de persulfure entre NFS1 et ISCU en présence de fer dans ISCU. Ce qui permet d'accélérer la réaction d'assemblage de centres [2Fe2S], car le transfert est résultat est l'étape limitante de tout le processus d'assemblage. Ces résultats permettent d'expliquer la dépendance en frataxine observée *in vivo*. Ces résultats sont à mettre en regard de ceux précédemment obtenus au laboratoire montrant que FXN accélère aussi cette réaction lorsque du zinc est présent dans le site d'assemblage à la place du fer. Pour comprendre comment la frataxine accélère le transfert de persulfure, nous avons commencé à étudier plus en détail le mécanisme de cette étape. Nous avons identifié deux résidus clés pouvant moduler la vitesse de transfert de persulfure : l'histidine 103 et la méthionine 106. Dans un mutant H103A, nous avons trouvé que la cystéine 104 peut venir prendre la place de l'histidine 103. Cela reflète d'une part la flexibilité du site d'assemblage, mais également la possibilité d'un mouvement d'His103 qui permettrait le rapprochement de Cys104 pouvant ainsi favoriser le transfert de persulfure. En ce sens, les études réalisées par Batoul Srour (Post-Doc) au laboratoire ont montré que le transfert de persulfure est fortement accéléré dans le mutant H103A, quasiment au niveau de la réaction avec FXN. De plus, la structure du complexe NIAU avec FXN montre que FXN écarte His103 du centre métallique. Ces résultats suggèrent donc que le mouvement de His103 est un élément clé du mécanisme de transfert de persulfure et de son accélération par FXN. Il serait intéressant à ce stade, d'obtenir des informations à l'échelle atomique des différents intermédiaires pour comprendre ce processus. L'obtention de cristaux pour le complexe eucaryote n'ayant pas fonctionné nous sommes orientés vers la microscopie électronique. Cependant, l'hétérogénéité des échantillons ne nous a pas permis d'obtenir de structure. Il sera donc nécessaire d'améliorer la stabilité du complexe et de ces intermédiaires afin d'obtenir des échantillons homogènes. Il serait également intéressant d'étudier plus en détail l'action de la frataxine bactérienne. En effet, nous avons observé que CyaY accélère le transfert de persulfure avec la machinerie eucaryote mais dans une moindre mesure que la frataxine eucaryote. Ceci est probablement dû à une évolution de la frataxine eucaryote via l'acquisition de mutations ayant fait apparaître des résidus clés pour activer le transfert de persulfure, dont les résidus asparagine 151 et sérine 157 qui semblent jouer un rôle important pour le mouvement de Cys104 vers le métal et le retrait de Cys35 pour libérer une position sur le métal afin de permettre la fixation du persulfure de NFS1. Il serait donc intéressant d'étudier des mutants de CyaY tels que L151N et A157S et d'autres afin de mettre en évidence les résidus de la frataxine directement impliqués dans le transfert. Nous avons également observé que la vitesse de transfert de persulfure peut être modulée par la nature du résidu en position 106 très proche du centre métallique (numérotation de *M. musculus*). En effet, en mutant le résidu méthionine présent chez les eucaryotes par une isoleucine présente chez les procaryotes le transfert de persulfure est accéléré. Chez *E. coli*, la présence d'une isoleucine à cette position permet un transfert de persulfure très rapide expliquant ainsi la non-dépendance en frataxine de cette machinerie. Le mécanisme par lequel le résidu en position 106 module la vitesse de transfert reste à déterminer, mais

Conclusions et Perspectives

sachant qu'il est spatialement proche de l'histidine 103, tout porte à croire qu'il intervient dans le mouvement de His103.

Nous avons enfin cherché à déterminer le rôle de la frataxine bactérienne, CyaY. Nous avons trouvé qu'en raison de la présence de l'isoleucine en position 106 dans IscU, la réaction de transfert de persulfure est naturellement rapide et n'est pas l'étape cinétiquement déterminante du processus d'assemblage. Par conséquent, bien que CyaY soit capable d'accélérer le transfert de persulfure, cela n'a pas d'impact sur la vitesse d'assemblage. La fonction biologique originelle de la frataxine semble donc différente de celle acquise au cours de l'évolution par FXN. Nous avons trouvé que CyaY procure une protection contre le fer libre. En effet, en présence de fer libre, l'assemblage des centres Fe-S est ralenti, apparemment en raison d'un effet réducteur non-spécifique du couple fer-Fdx sur les persulfures d'IscS et IscU, et CyaY protège la machinerie contre cet effet toxique. Ces résultats semblent cohérents avec les observations faites *in vivo* chez *E. coli* montrant que l'assemblage des centres Fe-S est altéré en absence de CyaY spécifiquement en conditions riches en fer (Roche & al, 2015). L'effet toxique du fer reste tout de même surprenant et une démonstration de son action toxique en conditions physiologiques, *in vivo*, reste à établir. Cependant, Beata Monfort (postdoc au laboratoire) a montré que la machinerie humaine n'était pas inhibée en présence de fer libre. Ce mécanisme semble donc spécifique aux procaryotes, ce qui renforce l'idée que CyaY serait nécessaire *in vivo* pour protéger l'assemblage Fe-S contre la toxicité du fer libre.

Bibliographie

Bibliographie

- A**dam, A. C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W. & Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO Journal*, 25(1), 174-183.
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., & Isaya, G. (2000). Iron-Dependent Self-Assembly of Recombinant Yeast Frataxin : Implications for Friedreich Ataxia. *The American Journal of Human Genetics*, 67(3), 549-562.
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., Bonomi, F., & Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(4), 7.
- Adinolfi, S., Rizzo, F., Masino, L., Nair, M., Martin, S. R., Pastore, A., & Temussi, P. A. (2004). Bacterial IscU is a well folded and functional single domain protein. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2093-2100.
- Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R., & Johnson, M. K. (2000). IscU as a Scaffold for Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis : Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters in IscU. *Biochemistry*, 39(27), 7856-7862.
- Ahting, U., Mayr, J. A., Vanlander, A. V., Hardy, S. A., Santra, S., Makowski, C., Alston, C. L., Zimmermann, F. A., Abela, L., Plecko, B., Rohrbach, M., Spranger, S., Seneca, S., Rolinski, B., Hagedorff, A., Hempel, M., Sperl, W., Meitinger, T., Smet, J., ... Haack, T. B. (2015). Clinical, biochemical, and genetic spectrum of seven patients with NFU1 deficiency. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(11), 2137-2143.
- Ajit Bolar, N., Vanlander, A. V., Wilbrecht, C., Van der Aa, N., Smet, J., De Paepe, B., Vandeweyer, G., Kooy, F., Eyskens, F., De Letter, E., Delanghe, G., Govaert, P., Leroy, J. G., Loeys, B., Lill, R., Van Laer, L., & Van Coster, R. (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2590-2602.
- Albers, A., Demeshko, S., Pröpper, K., Dechert, S., Bill, E., & Meyer, F. (2013). A Super-Reduced Diferrous [2Fe–2S] Cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 135(5), 1704-1707.
- Al-Hassnan, Z. N., Al-Dosary, M., Alfadhel, M., Faqeih, E. A., Alsagob, M., Kenana, R., Almass, R., Al-Harazi, O. S., Al-Hindi, H., Malibari, O. I., Almutari, F. B., Tulbah, S., Alhadeq, F., Al-Sheddi, T., Alamro, R., AlAsmari, A., Almuntashri, M., Alshaalan, H., Al-Mohanna, F. A., ... Kaya, N. (2015). ISCA2 mutation causes infantile neurodegenerative mitochondrial disorder. *Journal of Medical Genetics*, 52(3), 186-194.
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., & Nozaki, T. (2004). An Intestinal Parasitic Protist, *Entamoeba histolytica*, Possesses a Non-redundant Nitrogen Fixation-like System for Iron-Sulfur Cluster Assembly under Anaerobic Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16863-16874.
- Al-Karadaghi, S., Franco, R., Hansson, M., Shelnutt, J. A., Isaya, G., & Ferreira, G. C. (2006). Chelataes : Distort to select? *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 135-142.
- Almirón, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 6(12b), 2646-2654.
- Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., & Craig, E. A. (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO reports*, 5(11), 1096-1101.

Bibliographie

- Anastassopoulou, I., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Katsari, E., & Rosato, A. (2004). Solution Structure of the Apo and Copper(I)-Loaded Human Metallochaperone HAH1. *Biochemistry*, 43(41), 13046-13053.
- Andreini, C., Putignano, V., Rosato, A., & Banci, L. (2018). The human iron-proteome. *Metallomics*, 10(9), 1223-1231.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Andrew, A. J., Dutkiewicz, R., Knieszner, H., Craig, E. A., & Marszalek, J. (2006). Characterization of the Interaction between the J-protein Jac1p and the Scaffold for Fe-S Cluster Biogenesis, Isu1p. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14580-14587.
- Angerer, H. (2015). Eukaryotic LYR Proteins Interact with Mitochondrial Protein Complexes. *Biology*, 4(1), 133-150.
- Angerer, H., Radermacher, M., Ma kowska, M., Steger, M., Zwicker, K., Heide, H., Wittig, I., Brandt, U., & Zickermann, V. (2014). The LYR protein subunit NB4M/NDUFA6 of mitochondrial complex I anchors an acyl carrier protein and is essential for catalytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5207-5212.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Huffman, D. L., & O'Halloran, T. V. (2001). Solution Structure of the Cu(I) and Apo Forms of the Yeast Metallochaperone, Atx1. *Biochemistry*, 40(6), 1528-1539.
- Aron, A. T., Loehr, M. O., Bogena, J., & Chang, C. J. (2016). An Endoperoxide Reactivity-Based FRET Probe for Ratiometric Fluorescence Imaging of Labile Iron Pools in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 138(43), 14338-14346.
- Arosio, P., Ingrassia, R., & Cavadini, P. (2009). Ferritins : A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(7), 589-599.
- Atta, M., Arragain, S., Fontecave, M., Mulliez, E., Hunt, J. F., Luff, J. D. & Forouhar, F. (2012). The methylthiolation reaction mediated by the Radical-SAM enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1824(11), 1223-1230.
- Atkinson, A., Smith, P., Fox, J. L., Cui, T. Z., Khalimonchuk, O. & Winge, D. R. (2011). The LYR Protein Mzml Functions in the Insertion of the Rieske Fe/S Protein in Yeast Mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 31(19), 3988-3996.
- B**a, L. A., Doering, M., Burkholz, T., & Jacob, C. (2009). Metal trafficking : From maintaining the metal homeostasis to future drug design. *Metallomics*, 1(4), 292.
- Bagg, A., & Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli. *Biochemistry*, 26(17), 5471-5477.
- Bali, P. K., Zak, O., & Aisen, P. (1991). A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Journal of the American Chemical Society*, 30(2), 324-328.
- Banci, L., Bertini, I., & Del Conte, R. (2003). Solution Structure of Apo CopZ from Bacillus subtilis : Further Analysis of the Changes Associated with the Presence of Copper. *Biochemistry*, 42(46), 13422-13428.

Bibliographie

- Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Conte, R. D., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., & Winkelmann, J. (2014). [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6203-6208.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K. & Rouhier, N. (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *The EMBO journal*, 27, 1122-1133.
- Beilschmidt, L. K., Ollagnier de Choudens, S., Fournier, M., Sanakis, I., Hograindleur, M.-A., Clémancey, M., Blondin, G., Schmucker, S., Eisenmann, A., Weiss, A., Koebel, P., Messaddeq, N., Puccio, H., & Martelli, A. (2017). ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nature Communications*, 8(1), 15124.
- Beinert, H. & Sands, R. H. (1960). Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 3(1), 41-46.
- Beinert, H., & Kennedy, M. C. (1993). Aconitase, a two-faced protein : Enzyme and iron regulatory factor. *The FASEB Journal*, 7(15), 1442-1449.
- Beinert, H., Holm, R. H., & Münck, E. (1997). Iron-Sulfur Clusters : Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science*, 277(5326), 653-659.
- Benjdia, A., Balty, C., & Berteau, O. (2017). Radical SAM Enzymes in the Biosynthesis of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides (RiPPs). *Frontiers in Chemistry*, 5.
- Bitto, E., Bingman, C. A., Bittova, L., Kondrashov, D. A., Bannen, R. M., Fox, B. G., Markley, J. L., & Phillips, G. N. (2008). Structure of Human J-type Co-chaperone HscB Reveals a Tetracysteine Metal-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30184-30192.
- Black, K. A., & Dos Santos, P. C. (2015). Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors : Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853(6), 1470-1480.
- Boniecki, M. T., Freibert, S. A., Mühlenhoff, U., Lill, R., & Cygler, M. (2017). Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nature Communications*, 8(1), 1287.
- Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., & Vickery, L. E. (2011). Facilitated Transfer of IscU-[2Fe2S] Clusters by Chaperone-Mediated Ligand Exchange. *Biochemistry*, 50(44), 9641-9650.
- Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T. M., & Dennis Chasteen, N. (2004). Iron Binding and Oxidation Kinetics in Frataxin CyaY of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 341(2), 605-615.
- Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15(4), 325-339.
- Bouton, C., & Drapier, J.-C. (2003). Iron Regulatory Proteins as NO Signal Transducers. *Science STKE*, 182, pe17.
- Boyd, E. S., Thomas, K. M., Dai, Y., Boyd, J. M., & Outten, F. W. (2014). Interplay between Oxygen and Fe-S Cluster Biogenesis : Insights from the Suf Pathway. *Biochemistry*, 53(37), 5834-5847.
- Bradley, J. L., Homayoun, S., Hart, P. E., Schapira, A. H. V., & Cooper, J. M. (2004). Role of Oxidative Damage in Friedreich's Ataxia. *Neurochemical Research*, 29(3), 561-567.

Bibliographie

- Bradley, J. M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Hemmings, A. M., Moore, G. R., & Le Brun, N. E. (2020). Bacterial iron detoxification at the molecular level. *Journal of Biological Chemistry*, 295(51), 17602-17623.
- Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., & Cio, S. (2014). Formation of [4Fe-4S] Clusters in the Mitochondrial Iron–Sulfur Cluster Assembly Machinery. *Journal of the American Chemical Society*, 11.
- Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB–ExbB–ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(4), 295-307.
- Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C.-L., Winn, A. M., & Barondeau, D. P. (2014). Human Frataxin Activates Fe–S Cluster Biosynthesis by Facilitating Sulfur Transfer Chemistry. *Biochemistry*, 53, 4904-4913.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., & Loréal, O. (2012). Non-transferrin bound iron : A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820(3), 403-410.
- Broderick, W. E., Hoffman, B. M., & Broderick, J. B. (2018). Mechanism of Radical Initiation in the Radical S-Adenosyl-L-methionine Superfamily. *Accounts of chemical research*, 51(11), 2611-2619.
- Brody, S., Oh, C., Hoja, U. & Schweizer, E. (1997). Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 408, 217-220.
- Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X., Rorbach, J., Amunts, A., & Ramakrishnan, V. (2017). Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), 866-869.
- Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology*, 6(1), 56-63.
- Bulteau, A.-L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. & Szweda, L. I. (2004). Frataxin Acts as an Iron Chaperone Protein to Modulate Mitochondrial Aconitase Activity. *Science*, 305(5681), 242-245.
- Byers, B. R. & Arceneaux, J. E. L. (1998). Microbial Iron Transport : Iron acquisition by pathogenic microorganisms. *Metal Ions in Biological Systems*, 35, 37-66.
- C**ai, K., Liu, G., Frederick, R. O., Xiao, R., Montelione, G. T., & Markley, J. L. (2016). Structural/Functional Properties of Human NFU1, an Intermediate [4Fe-4S] Carrier in Human Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *Structure*, 24(12), 2080-2091.
- Caltagirone, A., Weiss, G., & Pantopoulos, K. (2001). Modulation of Cellular Iron Metabolism by Hydrogen Peroxide: Effects of H₂O₂ on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 19738-19745.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., & Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, 110(4), 1353-1358.
- Camaschella, C. (2015). Iron-deficiency Anemia. *The New England Journal of Medicine*, 372, 1832-1843.

Bibliographie

- Cameron, J. M., Janer, A., Levandovskiy, V., MacKay, N., Rouault, T. A., Tong, W. H., Ogilvie, I., Shoubridge, E. A. & Robinson, B. H. (2011). Mutations in Iron-Sulfur Cluster Scaffold Genes NFU1 and BOLA3 Cause a Fatal Deficiency of Multiple Respiratory Chain and 2-Oxoacid Dehydrogenase Enzymes. *Journal of Human Genetics*, 89, 486-495.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., Michele, G. D., Filla, A., ... Pandolfo, M. (1996). Friedreich's Ataxia : Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science*, 271(5254), 1423-1427.
- Castro, L., Tórtora, V., Mansilla, S., & Radi, R. (2019). Aconitases : Non-redox Iron–Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species. *Accounts of Chemical Research*, 52(9), 2609-2619.
- Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Levi, S., Verardi, R., Zanella, I., Derosas, M., Ingrassia, R., Corrado, M., & Arosio, P. (2007). RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood*, 109(8), 3552-3559.
- Chahal, H. K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., and Outten, F. W. (2009). The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry*, 48, 10644-10653.
- Chahal, H. K., & Outten, F. W. (2012). Separate Fe-S scaffold and carrier functions for SufB2C2 and SufA during in vitro maturation of [2Fe-2S] Fdx. *J. Inorg. Biochem.*, 116, 126-134.
- Chakrabarti, M., Cockrell, A. L., Park, J., McCormick, S. P., Lindahl, L. S., & Lindahl, P. A. (2015). Speciation of iron in mouse liver during development, iron deficiency, IRP2 deletion and inflammatory hepatitis. *Metallomics*, 7(1), 93-101.
- Chareyre, S. & Mandin, P. (2018). Bacterial Iron Homeostasis Regulation by sRNAs. *Microbiol Spectr.*, 6(2), RWR-0010-2017.
- Chen, Z. & Lash, L. H. (1998). Evidence for mitochondrial uptake of Glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2), 608-618.
- Chen, W., Dailey, H. A. & Paw, B. H. (2010). Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*, 116(4), 628-630.
- Chen, W., Paradkar, P. N., Li, L., Pierce, E. L., Langer, N. B., Takahashi-Makise, N., Hyde, B. B., Shirihai, O. S., Ward, D. M., Kaplan, J., & Paw, B. H. (2009). Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in erythroid mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16263-16268.
- Cho, S.-J., Lee, M. G., Yang, J. K., Lee, J. Y., Song, H. K., & Suh, S. W. (2000). Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8932-8937.
- Chollangi, S., Thompson, J. W., Ruiz, J. C., Gardner, K. H., & Bruick, R. K. (2012). Hemerythrin-like Domain within F-box and Leucine-rich Repeat Protein 5 (FBXL5) Communicates Cellular Iron and Oxygen Availability by Distinct Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23710-23717.
- Ciesielski, S. J., Schilke, B. A., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., Joachimiak, A., Marszalek, J., Craig, E. A., & Dutkiewicz, R. (2012). Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe–S Scaffold Isu Is Indispensable In Vivo and Conserved in Evolution. *Journal of Molecular Biology*, 417(1), 1-12.

Bibliographie

Colin, F., Martelli, A., Clem, M., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., & de Choudens, S. O. (2013). Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe₄S₄ Cluster Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 8.

Collins, J. F., Franck, C. A., Kowdley, K. V., & Ghishan, F. K. (2005). Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5), G964-G971.

Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Rufini, A., Tomassini, B., & Testi, R. (2007). In vivo maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 16(13), 1534-1540.

Cook, J. D., Bencze, K. Z., Jankovic, A. D., Crater, A. K., Busch, C. N., Bradley, P. B., Stemmler, A. J., Spaller, M. R., & Stemmler, T. L. (2006). Monomeric Yeast Frataxin Is an Iron-Binding Protein. *Biochemistry*, 45(25), 7767-7777.

Cory, S. A., Van Vranken, J. G., Brignole, E. J., Patra, S., Winge, D. R., Drennan, C. L., Rutter, J., & Barondeau, D. P. (2017). Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP–ISD11 interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), E5325-E5334.

Couturier, J., Wu, H. C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J. M., Jacquot, J. P., Gaymard, F., Vignols, F. & Rouhier, N. (2014). Monothiol Glutaredoxin-BolA Interactions : Redox Control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1. *Molecular Plant*, 7(1), 187-205.

Couturier, J., Przybyla-Toscano, J., Roret, T., Didierjean, C., & Rouhier, N. (2015). The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters : Sensing, transfer or repair functions? *Biochim. Biophys. Acta*, 1853(6), 1513-1527.

Cupp-Vickery, J. R., Peterson, J. C., Ta, D. T., & Vickery, L. E. (2004). Crystal Structure of the Molecular Chaperone HscA Substrate Binding Domain Complexed with the IscU Recognition Peptide ELPPVKIHC. *Journal of Molecular Biology*, 342(4), 1265-1278.

Cupp-Vickery, J. R., Urbina, H., & Vickery, L. E. (2003). Crystal Structure of IscS, a Cysteine Desulfurase from Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 330(5), 1049-1059.

D'Autréaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez de Peredo, A., Diederix, R. E. M., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E., & Michaud-Soret, I. (2007). Reversible Redox- and Zinc-Dependent Dimerization of the Escherichia coli Fur Protein. *Biochemistry*, 46(5), 1329-1342.

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules : Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.

Daher, R., Mansouri, A., Martelli, A., Bayart, S., Manceau, H., Callebaut, I., Moulouel, B., Gouya, L., Puy, H., Kannengiesser, C., & Karim, Z. (2019). GLRX5 mutations impair heme biosynthetic enzymes ALA synthase 2 and ferrochelatase in Human congenital sideroblastic anemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 128(3), 342-351.

Deng, L., & Holm, R. H. (2008). Stabilization of Fully Reduced Iron–Sulfur Clusters by Carbene Ligation : The [Fe_nS_n]⁰ Oxidation Levels (n = 4, 8). *Journal of the American Chemical Society*, 130(30), 9878-9886.

Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., & Massé, E. (2009). Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *The EMBO Journal*, 28(11), 1551-1561.

Bibliographie

Devireddy, L. R., Hart, D. O., Goetz, D. H., & Green, M. R. (2010). A Mammalian Siderophore Synthesized by an Enzyme with a Bacterial Homolog Involved in Enterobactin Production. *Cell*, 141(6), 1006-1017.

Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.-I., Ristow, M., & Shoelson, S. E. (2000). Crystal Structure of Human Frataxin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 30753-30756.

Ding, B., Smith, E. S., & Ding, H. (2005). Mobilization of the iron centre in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU. *Biochemistry*, 389, 797-802.

Ding, H., Clark, R. J., & Ding, B. (2004). IscA Mediates Iron Delivery for Assembly of Iron-Sulfur Clusters in IscU under the Limited Accessible Free Iron Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37499-37504.

Dlouhy, A. C., & Outten, C. E. (2013). The Iron Metallome in Eukaryotic Organisms. *Metal ions in life sciences*, 12, 241-278.

Dudev, T., & Lim, C. (2014). Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites : Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. *Chemical Reviews*, 114(1), 538-556.

Dutkiewicz, R., & Nowak, M. (2018). Molecular chaperones involved in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(4), 569-579.

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. A., & Marszalek, J. (2004). Sequence-specific Interaction between Mitochondrial Fe-S Scaffold Protein Isu and Hsp70 Ssq1 Is Essential for Their in Vivo Function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29167-29174.

Eng, E. T., Jalilian, A. R., Spasov, K. A., & Unger, V. M. (2008). Characterization of a Novel Prokaryotic GDP Dissociation Inhibitor Domain from the G Protein Coupled Membrane Protein FeoB. *Journal of Molecular Biology*, 375(4), 1086-1097.

Escolar, L., Lorenzo, V. de, & Pérez-Martín, J. (1997). Metalloregulation in vitro of the aerobactin promoter of Escherichia coli by the Fur (ferric uptake regulation) protein. *Molecular Microbiology*, 26(4), 799-808.

Epsztejn, S., Glickstein, H., Picard, V., Slotki, I. N., Breuer, W., Beaumont, C., & Cabantchik, Z. I. (1999). H-Ferritin Subunit Overexpression in Erythroid Cells Reduces the Oxidative Stress Response and Induces Multidrug Resistance Properties. *Blood*, 94(10), 3593-3603.

Farhan, S. M. K., Wang, J., Robinson, J. F., Lahiry, P., Siu, V. M., Prasad, C., Kronick, J. B., Ramsay, D. A., Rupar, C. A., & Hegele, R. A. (2014). Exome sequencing identifies NFS1 deficiency in a novel Fe-S cluster disease, infantile mitochondrial complex II/III deficiency. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2(1), 73-80.

Ferecatu, I., Gonçalves, S., Golinelli-Cohen, M.-P., Clémancey, M., Martelli, A., Riquier, S., Guittet, E., Latour, J.-M., Puccio, H., Drapier, J.-C., Lescop, E., & Bouton, C. (2014). The Diabetes Drug Target MitoNEET Governs a Novel Trafficking Pathway to Rebuild an Fe-S Cluster into Cytosolic Aconitase/Iron Regulatory Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28070-28086.

Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., Helm, D. van der, & Deisenhofer, J. (2002). Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. *Science*, 295(5560), 1715-1719.

Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (1998). Siderophore-Mediated Iron Transport : Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397), 2215-2220.

Bibliographie

Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews*, 118(3), 1253-1337.

Filla, A., DeMichele, G., Caruso, G., Marconi, R., & Campanella, G. (1990). Genetic data and natural history of Friedreich's disease : A study of 80 Italian patients. *Journal of Neurology*, 237, 345-351.

Fleming, M. D., Trenor, C. C., Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., & Andrews, N. C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*, 16(4), 383-386.

Fontecave, M., Covès, J., & Pierre, J.-L. (1994). Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals*, 7(1).

Foster, A. W., Osman, D., & Robinson, N. J. (2014). Metal Preferences and Metallation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28095-28103.

Foury, F., & Roganti, T. (2002). Deletion of the Mitochondrial Carrier Genes MRS3 and MRS4 Suppresses Mitochondrial Iron Accumulation in a Yeast Frataxin-deficient Strain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24475-24483.

Fox, N. G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H. J., Martelli, A., Nabhan, J. F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W. W. & Han, S. (2019). Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nature Communications*, 10, 2210.

Freibert, S.-A., Goldberg, A. V., Hacker, C., Molik, S., Dean, P., Williams, T. A., Nakjang, S., Long, S., Sendra, K., Bill, E., Heinz, E., Hirt, R. P., Lucocq, J. M., Embley, T. M., & Lill, R. (2017). Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nature Communications*, 8(1), 13932.

Frey, P. A., Hegeman, A. D., & Ruzicka, F. J. (2008). The Radical SAM Superfamily. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1), 63-88.

Friedreich, N. (1863). "XVII. Leber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge". *Virchows Arch. Pathol.*, 26, 391-419.

Fu, W., Jack, R. F., Morgan, T. V., Dean, D. R., & Johnson, M. K. (1994). NifU Gene Product from *Azotobacter vinelandii* Is a Homodimer That Contains Two Identical [2Fe-2S] Clusters. *Biochemistry*, 33(45), 13455-13463.

Fuss, J. O., Tsai, C. L., Ishida, J. P. & Tainer, J. A. (2015). Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853(6), 1253-1271.

Füzéry, A. K., Tonelli, M., Ta, D. T., Cornilescu, G., Vickery, L. E., & Markley, J. L. (2008). Solution Structure of the Iron-Sulfur Cluster Cochaperone HscB and Its Binding Surface for the Iron-Sulfur Assembly Scaffold Protein IscU. *Biochemistry*, 47(36), 9394-9404.

Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A. M., Twesten, R. D., Owen, W. G., & Isaya, G. (2002). Physical Evidence that Yeast Frataxin Is an Iron Storage Protein. *Biochemistry*, 41(21), 6798-6804.

Galardon, E., Roger, T., Deschamps, P., Roussel, P., Tomas, A., & Artaud, I. (2012). Synthesis of a Fe II SH Complex Stabilized by an Intramolecular N-H...S Hydrogen Bond, Which Acts as a H₂S Donor. *Inorganic Chemistry*, 51(19), 10068-10070.

Galaris, D., Barbouti, A., & Pantopoulos, K. (2019). Iron homeostasis and oxidative stress : An intimate relationship. *Biochim. Biophys. Acta*, 1866(12), 118535.

Bibliographie

- Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E., & Culotta, V. C. (1999). Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2 : Members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *Journal of Molecular Biology*, 294(4), 897-907.
- Gerber, J., Mühlenhoff, U., & Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO reports*, 4(9), 906-911.
- Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., & Bork, P. (1996). Friedreich's ataxia protein : Phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends in Neurosciences*, 19(11), 465-468.
- Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820(3), 188-202.
- Gourdoupis, S., Nasta, V., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., & Banci, L. (2018). IBA57 Recruits ISCA2 to Form a [2Fe-2S] Cluster-Mediated Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 14401-14412.
- Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y., & Leibold, E. A. (1995). Iron Regulates the Intracellular Degradation of Iron Regulatory Protein 2 by the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21645-21651.
- H**aack, T. B., Rolinski, B., Haberberger, B., Zimmermann, F., Schum, J., Strecker, V., Graf, E., Athing, U., Hoppen, T., Wittig, I., Sperl, W., Freisinger, P., Mayr, J. A., Strom, T. M., Meitinger, T., & Prokisch, H. (2013). Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(1), 55-62.
- Hagen, K. S., Reynolds, J. G., & Holm, R. H. (1981). Definition of reaction sequences resulting in self-assembly of [Fe₄S₄(SR)₄]²⁻ clusters from simple reactants. *Journal of the American Chemical Society*, 103(14), 4054-4063.
- Hall, A. (1992). Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, 3(5), 475-479.
- Hanson, E. S., Rawlins, M. L., & Leibold, E. A. (2003). Oxygen and Iron Regulation of Iron Regulatory Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 40337-40342.
- Hantke, K. (1984). Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in Escherichia coli K12. *Mol. Gen. Genet.*, 197, 337-341.
- Hantke, K. (1987). Ferrous iron transport mutants in Escherichia coli K12. *FEMS Microbiology Letters*, 44(1), 53-57.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), 172-177.
- Hantke, K. (2003). Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends in Microbiology*, 11(5), 192-195.
- Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A. J., Mühlenhoff, U., & Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35 : An essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3266-3271.
- He, Y., Alam, S. L., Proteasa, S. V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., & Stemmler, T. L. (2004). Yeast Frataxin Solution Structure, Iron Binding, and Ferrochelatase Interaction. *Biochemistry*, 43, 16254-16262.

Bibliographie

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to Tango : Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell*, 142(1), 24-38.

Herrera, M. G., Noguera, M. E., Sewell, K. E., Agudelo Suárez, W. A., Capece, L., Klinke, S., & Santos, J. (2019). Structure of the Human ACP-ISD11 Heterodimer. *Biochemistry*, 58(46), 4596-4609.

Herskovitz, T., Averill, B. A., Holm, R. H., Ibers, J. A., Phillips, W. D., & Weiher, J. F. (1972). Structure and Properties of a Synthetic Analogue of Bacterial Iron-Sulfur Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(9), 2437-2441.

Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637.

Hider, R. C., & Kong, X. L. (2011). Glutathione : A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals*, 24(6), 1179-1187.

Hider, R. C., & Kong, X. (2013). Iron : Effect of Overload and Deficiency. *Met. Ions Life Sci.*, 13, 229-294.

Hiltunen, J. K., Autio, K. J., Schonauer, M. S., Samuli Kursu, V. A., Dieckmann, C. L. & Kastaniotis, A. J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 1195-1202.

Hoff, K. G., Silberg, J. J., & Vickery, L. E. (2000). Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7790-7795.

Holliday, G. L., Akiva, E., Meng, E. C., Brown, S. D., Calhoun, S., Pieper, U., Sali, A., Booker, S. J., & Babbitt, P. C. (2018). Atlas of the Radical SAM Superfamily : Divergent Evolution of Function Using a “Plug and Play” Domain. *Methods in Enzymology*, 606, 1-71.

Hsueh, K.-L., Yu, L.-K., Chen, Y.-H., Cheng, Y.-H., Hsieh, Y.-C., Ke, S., Hung, K.-W., Chen, C.-J., & Huang, T. (2013). FeoC from Klebsiella pneumoniae Contains a [4Fe-4S] Cluster. *Journal of Bacteriology*, 195(20), 4726-4734.

Huang, J., Dizin, E., & Cowan, J. A. (2008). Mapping iron binding sites on human frataxin : Implications for cluster assembly on the ISU Fe–S cluster scaffold protein. *J Biol Inorg Chem*, 13:825-836.

Huber, C., & Wächtershäuser, G. (1998). Peptides by Activation of Amino Acids with CO on (Ni,Fe)S Surfaces : Implications for the Origin of Life. *Science*, 281(5377), 670-672.

Hung, K.-W., Juan, T., Hsu, Y., & Huang, T. H. (2012). NMR structure note : The ferrous iron transport protein C (FeoC) from Klebsiella pneumoniae. *Journal of Biomolecular NMR*, 53(2), 161-165.

Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P., & Gibson, T. J. (2001). The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Human Molecular Genetics*, 10(21), 2463-2468.

Iannuzzi, C., Adrover, M., Puglisi, R., Yan, R., Temussi, P. A., & Pastore, A. (2014). The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein. *Protein Science*, 23(9), 1208-1219.

Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006). Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Molecular Cell*, 21(1), 97-108.

Im, S.-C., Lam, K.-Y., Lim, M.-C., Ooi, B.-L., & Sykes, A. G. (1995). First Report of a 2-equiv Reduction of [2Fe-2S] Ferredoxins. *Journal of the American Chemical Society*, 117(12), 3635-3636.

Bibliographie

Im, S.-C., Kohzuma, T., McFarlane, W., Gaillard, J., & Sykes, A. G. (1997). Formation, Properties, and Characterization of a Fully Reduced FeII FeII Form of Spinach (and Parsley) [2Fe-2S] Ferredoxin with the Macrocyclic Complex $[\text{Cr}(15\text{-aneN}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ as Reductant. *Inorganic Chemistry*, 36(7), 1388-1396.

Iwai, K., Drake, S. K., Wehr, N. B., Weissman, A. M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R. D., Levine, R. L., & Rouault, T. A. (1998). Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 4924-4928.

Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E., & Dean, D. R. (1989). Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.*, 219:49-57.

Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., & Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 247-281.

Johnson, D. C., Unciuleac, M.-C., & Dean, D. R. (2006). Controlled Expression and Functional Analysis of Iron-Sulfur Cluster Biosynthetic Components within *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7551-7561.

Johnson, M. A., Chatterjee, A., Neuman, B. W., & Wüthrich, K. (2010). SARS Coronavirus Unique Domain: Three-Domain Molecular Architecture in Solution and RNA Binding. *Journal of Molecular Biology*, 400(4), 724-742.

Jung, Y.-S., Gao-Sheridan, H. S., Christiansen, J., Dean, D. R., & Burgess, B. K. (1999). Purification and Biophysical Characterization of a New [2Fe-2S] Ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a Putative [Fe-S] Cluster Assembly/Repair Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32402-32410.

Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2001). Crystal Structure of *Escherichia coli* Fdx, an Adrenodoxin-Type Ferredoxin Involved in the Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *Biochemistry*, 40(37), 11007-11012.

Kammler, M., Schön, C., & Hantke, K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(19), 6212-6219.

Kelley, S. O., Boon, E. M., Barton, J. K., Jackson, N. M., & Hill, M. G. (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Research*, 27(24), 4830-4837.

Khodour, Y., Kaguni, L. S. & Stiban, J. (2019). Iron-sulfur clusters in nucleic acid metabolism: Varying roles of ancient cofactors. *The Enzymes*, 45, 225-256.

Kim, J. H., Frederick, R. O., Reinen, N. M., Troupis, A. T., & Markley, J. L. (2013). [2Fe-2S]-Ferredoxin Binds Directly to Cysteine Desulfurase and Supplies an Electron for Iron-Sulfur Cluster Assembly but Is Displaced by the Scaffold Protein or Bacterial Frataxin. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 8117-8120.

Kim, J. H., Tonelli, M., Kim, T., & Markley, J. L. (2012). Three-Dimensional Structure and Determinants of Stability of the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein IscU from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 51, 5557-5563.

Kim, J. H., Tonelli, M., & Markley, J. L. (2012). Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 454-459.

Bibliographie

- Kim, K. S., Maio, N., Singh, A., & Rouault, T. A. (2018). Cytosolic HSC20 integrates de novo iron–sulfur cluster biogenesis with the CIAO1-mediated transfer to recipients. *Human Molecular Genetics*, 27(5), 837-852.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Journal*, 18(14), 3981-3989.
- Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, 152(3), 291-301.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O. & Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nature Genetics*, 16, 345-351.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., & Koenig, M. (1998). Maturation of Wild-Type and Mutated Frataxin by the Mitochondrial Processing Peptidase. *Human Molecular Genetics*, 7(9), 1485-1489.
- Krebs, C., Agar, J. N., Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H., & Johnson, M. K. (2001). IscA, an Alternate Scaffold for Fe–S Cluster Biosynthesis. *Biochemistry*, 40(46), 14069-14080.
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool : The main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1), 81-92.
- Kumar, C., Igarria, A., D'autréaux, B., Planson, A. G., Junot, C., Godat, E., Backhawat, A. K., Delaunay-Moisan, A. & Toledano, M. (2011). Glutathione revisited : A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO Journal*, 30(10), 2044-2056.
- Kunichika, K., Nakamura, R., Fujishiro, T., & Takahashi, Y. (2021). The Structure of the Dimeric State of IscU Harboring Two Adjacent [2Fe–2S] Clusters Provides Mechanistic Insights into Cluster Conversion to [4Fe–4S]. *Biochemistry*, 60(20), 1569-1572.
- Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y., & Hase, T. (2001). Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin- NADP+ reductase. *Nature Structural Biology*, 8(2), 117-121.
- L**abuda, M., Labuda, D., Miranda, C., Poirier, J., Soong, B. W., Barucha, N. E. & Pandolfo, M. (2000). Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology*, 54(12).
- Lane, D. J. R., Merlot, A. M., Huang, M. L.-H., Bae, D.-H., Jansson, P. J., Sahni, S., Kalinowski, D. S., & Richardson, D. R. (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism : Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853(5), 1130-1144.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., & Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1050-1055.
- Larsen, R. A., Thomas, M. G., Wood, G. E., & Postle, K. (1994). Partial suppression of an Escherichia coli TonB transmembrane domain mutation ($\Delta V17$) by a missense mutation in ExbB. *Molecular Microbiology*, 13(4), 627-640.
- Larsen, P. L., Gupta, R., Powell, D. R., & Borovik, A. S. (2004). Chalcogens as Terminal Ligands to Iron : Synthesis and Structure of Complexes with FeIII–S and FeIII–Se Motifs. *Journal of the American Chemical Society*, 126(21), 6522-6523.

Bibliographie

- Larsson, L. E., Linderholm, H., Müller, R., Ringqvist, T. & Sörnäs, R. (1964). Hereditary metabolic myopathy with paroxysmal myoglobinuria due to abnormal glycolysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 27, 361-380.
- Lash, L. H. (2006). Mitochondrial glutathione transport : Physiological, pathological and toxicological implications. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1-2), 54-67.
- Lau, C. K. Y., Ishida, H., Liu, Z., & Vogel, H. J. (2013). Solution Structure of Escherichia coli FeoA and Its Potential Role in Bacterial Ferrous Iron Transport. *Journal of Bacteriology*, 195(1), 46-55.
- Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2015). Bacterial ferrous iron transport : The Feo system. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 273-298.
- Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., & Fontecave, M. (2006). Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis : CHARACTERIZATION OF ESCHERICHIA COLI CYaY AS AN IRON DONOR FOR THE ASSEMBLY OF [2Fe-2S] CLUSTERS IN THE SCAFFOLD IscU. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16256-16263.
- Layer, G., Gaddam, S. A., Ayala-Castro, C. N., Ollagnier-de-Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F. W. (2007). SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.*, 282, 13342-13350.
- Lee, J. Y., Yang, J. G., Zhitnitsky, D., Lewinson, O., & Rees, D. C. (2014). Structural Basis for Heavy Metal Detoxification by an Atm1-Type ABC Exporter. *Science*, 343(6175), 1133-1136.
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P. P. & Di rago, J. P. (2001). Identification of a Nuclear Gene (FMC1) Required for the Assembly/Stability of Yeast Mitochondrial F1-ATPase in Heat Stress Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6789-6796.
- Leggatte, E. J., Bill, E., Essigke, T., Ullmann, G. M., & Hirst, J. (2004). Formation and characterization of an all-ferrous Rieske cluster and stabilization of the [2Fe-2S]⁰ core by protonation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 10913-10918.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757(9), 1406-1420.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B. F., Knight, S. A. B., Camadro, J.-M., & Dancis, A. (2003). Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Human Molecular Genetics*, 12(8), 879-889.
- Lewis, B. E., Mason, Z., Rodrigues, A. V., Nuth, M., Dizin, E., Cowan, J. A., & Stemmler, T. L. (2019). Unique roles of iron and zinc binding to the yeast Fe-S cluster scaffold assembly protein "Isu1". *Metallomics*, 11(11), 1820-1835.
- Li, D. S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M. W., & Pandolfo, M. (1999). Knock-out of the *cyaY* gene in Escherichia coli does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Letters*, 456, 13-16.
- Li, J., Kogan, M., Knight, S. A. B., Pain, D., & Dancis, A. (1999). Yeast Mitochondrial Protein, Nfs1p, Coordinately Regulates Iron-Sulfur Cluster Proteins, Cellular Iron Uptake, and Iron Distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33025-33034.
- Li, S. S. C. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochemical Journal*, 390(3), 641-653.

Bibliographie

- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffman, B. M., Riggs-Gelasco, P. J., Huynh, B. H., Johnson, M. K., & Outten, C. E. (2009). The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteinyll and Histidyl Ligation. *Biochemistry*, 48(40), 9569-9581.
- Li, J., & Cowan, J. A. (2015). Glutathione-coordinated [2Fe-2S] cluster: A viable physiological substrate for mitochondrial ABCB7 transport. *Chemical Communications*, 51(12), 2253-2255.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460(7257), 831-838.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C. & Mühlhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823(6), 1491-1508.
- Lim, S. C., Friemel, M., Marum, J. E., Tucker, E. J., Bruno, D. L., Riley, L. G., Christodoulou, J., Kirk, E. P., Boneh, A., DeGennaro, C. M., Springer, M., Mootha, V. K., Rouault, T. A., Thorburn, D. R., & Compton, A. G. (2013). Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Human Molecular Genetics*, 22(22), 4460-4473.
- Lin, C.-W., McCabe, J. W., Russell, D. H., & Barondeau, D. P. (2020). Molecular Mechanism of ISC Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Revealed by High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 142, 6018-6029.
- Liu, G., Guo, S., Anderson, G. J., Camaschella, C., Han, B., & Nie, G. (2014). Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood*, 124(17), 2750-2751.
- Liu, J., Oganessian, N., Shin, D.-H., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., & Kim, S.-H. (2005). Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(4), 875-881.
- Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D., & Cousins, R. J. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13612-13617.
- Lu, Y. (2018). Assembly and Transfer of Iron-Sulfur Clusters in the Plastid. *Frontiers in Plant Science*, 9(336).
- Lynch, D. R., Deutsch, E. C., Wilson, R. B., & Tennekoon, G. (2012). Unanswered Questions in Friedreich Ataxia. *Journal of child neurology*, 27(9), 1223-1229.
- M**addocks, S. E., & Oyston, P. C. F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154(12), 3609-3623.
- Malkin, R., & Rabinowitz, J. C. (1966). The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 23(6), 822-827.
- Manzella, L., Barros, M. H., & Nobrega, F. G. (1998). ARH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: A new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast*, 14(9), 839-846.
- Mapolelo, D. T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.-N., Li, H., Couturier, J., Outten, C. E., Rouhier, N., & Johnson, M. K. (2013). Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: Partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Transactions*, 42(9), 3107-3115.

Bibliographie

- Marelja, Z., Stöcklein, W., Nimtz, M., & Leimkühler, S. (2008). A Novel Role for Human Nfs1 in the Cytoplasm: Nfs1 ACTS AS A SULFUR DONOR FOR MOCS3, A PROTEIN INVOLVED IN MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25178-25185.
- Marinoni, E. N., de Oliveira, J. S., Nicolet, Y., Raulfs, E. C., Amara, P., Dean, D. R., & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). (IscS-IscU)₂ Complex Structures Provide Insights into Fe₂S₂ Biogenesis and Transfer. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22), 5439-5442.
- Marlovits, T. C., Haase, W., Herrmann, C., Aller, S. G., & Unger, V. M. (2002). The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16243-16248.
- Martelli, A., & Puccio, H. (2014). Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: From primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 130.
- Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4620-4625.
- Matzanke, B. F., Böhnke, R., Möllmann, U., Reissbrodt, R., Schünemann, V., & Trautwein, A. X. (1997). Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. *Biometals*, 10(3), 193-203.
- Mayron-Holtz, E. G., Ghosh, M. C. & Rouault, T. A. (2004). Mammalian tissue Oxygen levels modulate Iron-regulatory protein activities in vivo. *Science*, 306, 2087-2090.
- McCarthy, E. L., & Booker, S. J. (2017). Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science*, 358, 373-377.
- McCollom, T. M., & Seewald, J. S. (2007). Abiotic Synthesis of Organic Compounds in Deep-Sea Hydrothermal Environments. *Chemical Reviews*, 107(2), 382-401.
- McKie, A. T. (2008). The role of Dcytb in iron metabolism: An update. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1239-1241.
- McLaughlin, M. P., Retegan, M., Bill, E., Payne, T. M., Shafaat, H. S., Peña, S., Sudhamsu, J., Ensign, A. A., Crane, B. R., Neese, F., & Holland, P. L. (2012). Azurin as a Protein Scaffold for a Low-coordinate Nonheme Iron Site with a Small-molecule Binding Pocket. *Journal of the American Chemical Society*, 134(48), 19746-19757.
- Mettert, E. L. & Kiley, P. J. (2014). Coordinate Regulation of the Suf and Isc Fe-S Cluster Biogenesis Pathways by IscR Is Essential for Viability of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 196(24), 4315-4323.
- Meyer, J. (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2), 157-170.
- Mochel, F., Knight, M. A., Tong, W. H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P. M., Singleton, A., Rouault, T. A., Fischbeck, K. H. & Haller, R. G. (2008). Splice mutation in the iron sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *The American Journal of Human Genetics*, 82, 652-660.
- Montero, D., Tachibana, C., Winther, J. R. & Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biology*, 508-513.

Bibliographie

Morimoto, K., Yamashita, E., Kondou, Y., Lee, S. J., Arisaka, F., Tsukihara, T., & Nakai, M. (2006). The Asymmetric IscA Homodimer with an Exposed [2Fe-2S] Cluster Suggests the Structural Basis of the Fe-S Cluster Biosynthetic Scaffold. *Journal of Molecular Biology*, 360(1), 117-132.

Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. (2017). A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, 168(3), 344-361.

Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., & Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Human Molecular Genetics*, 11(17), 2025-2036.

Mühlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J. T., Sipos, K., Kispal, G., & Lill, R. (2004). Functional Characterization of the Eukaryotic Cysteine Desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36906-36915.

Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. H., & Lill, R. (2010). Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster. *Cell Metabolism*, 12(4), 373-385.

Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J., & Lill, R. (2011). Specialized Function of Yeast Isa1 and Isa2 Proteins in the Maturation of Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41205-41216.

Mui, T. P., Fuss, J. O., Ishida, J. P., Tainer, J. A., & Barton, J. K. (2011). ATP-Stimulated, DNA-Mediated Redox Signaling by XPD, a DNA Repair and Transcription Helicase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41), 16378-16381.

Na, U., Yu, W., Cox, J., Bricker, D. K., Brockmann, K., Rutter, J., Thummel, C. S. & Winge, D. R. (2014). The LYR Factors SDHAF1 and SDHAF3 Mediate Maturation of the Iron-Sulfur Subunit of Succinate Dehydrogenase. *Cell Metabolism*, 20, 253-266.

Nakamura, R., Hikita, M., Ogawa, S., Takahashi, Y., & Fujishiro, T. (2020). Snapshots of PLP-substrate and PLP-product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes. *The FEBS Journal*, 287(6), 1138-1154.

Nasta, V., Da Vela, S., Gourdoupis, S., Ciofi-Baffoni, S., Svergun, D. I. & Banci, L. (2019). Structural properties of [2Fe-2S] ISCA2-IBA57: A complex of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *Scientific Reports*, 9:18986.

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., & Kaplan, J. (2004). Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306(5704), 2090-2093.

Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Stümpfig, M., Bill, E., Sharma, A. K., Pallesen, L. J., Walden, W. E., & Lill, R. (2012). A Bridging [4Fe-4S] Cluster and Nucleotide Binding Are Essential for Function of the Cfd1-Nbp35 Complex as a Scaffold in Iron-Sulfur Protein Maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12365-12378.

Nicolet, Y. (2020). Structure–function relationships of radical SAM enzymes. *Nature Catalysis*, 3, 337-350.

Nuth, M., Yoon, T., & Cowan, J. A. (2002). Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Characterization of Iron Nucleation Sites for Assembly of the [2Fe-2S]²⁺ Cluster Core in IscU Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 8774-8775.

Bibliographie

- O**hgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388-1394.
- Ohnishi, T., Sled, V. D., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D. S., & Vinogradov, A. D. (1998). Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1365(1), 301-308.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., & Fontecave, M. (2001). Iron-Sulfur Cluster Assembly: CHARACTERIZATION OF IscA AND EVIDENCE FOR A SPECIFIC AND FUNCTIONAL COMPLEX WITH FERREDOXIN. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22604-22607.
- Ollagnier-de-Choudens S, Lascoux D, Loiseau L, Barras F, Forest E, Fontecave M. (2003). Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Letters*, 555:263–267.
- Olson, J. W., Agar, J. N., Johnson, M. K., & Maier, R. J. (2000). Characterization of the NifU and NifS Fe-S Cluster Formation Proteins Essential for Viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 39(51), 16213-16219.
- Olson, K. R., & Straub, K. D. (2015). The Role of Hydrogen Sulfide in Evolution and the Evolution of Hydrogen Sulfide in Metabolism and Signaling. *Physiology*, 31(1), 60-72.
- O'Neill, H. A., Gakh, O., & Isaya, G. (2005). Supramolecular Assemblies of Human Frataxin are Formed via Subunit-Subunit Interactions Mediated by a Non-conserved Amino-terminal Region. *Journal of Molecular Biology*, 345(3), 433-439.
- Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M., and Storz, G. (2003). The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 278, 45713-45719.
- P**antopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. *Biochemistry*, 51(29), 5705-5724.
- Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Regulation of Mitochondrial Iron Import through Differential Turnover of Mitoferrin 1 and Mitoferrin 2. *Molecular and Cellular Biology*, 29(4), 1007-1016.
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J. P., Grandas, A., Toledano, M. & D'autréaux, B. (2015). Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature communication*, 6:5686.
- Paul, A., Drecourt, A., Petit, F., Deguine, D. D., Vasnier, C., Oufadem, M., Masson, C., Bonnet, C., Masmoudi, S., Mosnier, I., Mahieu, L., Bouccara, D., Kaplan, J., Challe, G., Domange, C., Mochel, F., Sterkers, O., Gerber, S., Nitschke, P., ... Marlin, S. (2017). FDXR Mutations Cause Sensorial Neuropathies and Expand the Spectrum of Mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases. *The American Journal of Human Genetics*, 101(4), 630-637.
- Paul, V. D., & Lill, R. (2015). Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853(6), 1528-1539.
- Pérard, J. & Ollagnier de Choudens, S. (2018). Iron-sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: close to the molecular mechanism understanding. *J Biol Inorg Chem*, 23, 581–596.

Bibliographie

- Petrat, F., de Groot, H., & Rauen, U. (2001). Subcellular distribution of chelatable iron : A laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochemical Journal*, 356(Pt 1), 61-69.
- Picciochi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2007). CGFS-Type Monothiol Glutaredoxins from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and Other Evolutionary Distant Model Organisms Possess a Glutathione-Ligated [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*, 46(51), 15018-15026.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., & Loréal, O. (2001). A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7811-7819.
- Ponsero, A. J., Igbaria, A., Darch, M. A., Miled, S., Outten, C. E., Winther, J. R., Palais, G., D'Autréaux, B., Delaunay-Moisan, A., & Toledano, M. B. (2017). Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip. *Molecular Cell*, 67(6), 962-973.
- Postle, K. (1993). TonB protein and energy transduction between membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25(6), 591-601.
- Prischi, F., Giannini, C., Adinolfi, S., & Pastore, A. (2009). The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *The FEBS Journal*, 276(22), 6669-6676.
- Prischi, F., Konarev, P. V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S. R., Svergun, D. I., & Pastore, A. (2010). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nature Communications*, 10.
- Puccio, H., & Koenig, M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, 9(6), 887-892.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., & Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nature Genetics*, 27, 6.
- Puglisi, R., & Pastore, A. (2018). The role of chaperones in iron-sulfur cluster biogenesis. *FEBS Letters*, 592(24), 4011-4019.
- R**amazzotti, A., Vanmansart, V., & Foury, F. (2004). Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 557(1-3), 215-220.
- Ramelot, T. A., Cort, J. R., Goldsmith-Fischman, S., Kornhaber, G. J., Xiao, R., Shastry, R., Acton, T. B., Honig, B., Montelione, G. T., & Kennedy, M. A. (2004). Solution NMR Structure of the Iron-Sulfur Cluster Assembly Protein U (IscU) with Zinc Bound at the Active Site. *Journal of Molecular Biology*, 344(2), 567-583.
- Rauen, U., Springer, A., Weisheit, D., Petratt, F., Korth, H.-G., Groot, H. de, & Sustmann, R. (2007). Assessment of Chelatable Mitochondrial Iron by Using Mitochondrion-Selective Fluorescent Iron Indicators with Different Iron-Binding Affinities. *ChemBioChem*, 8(3), 341-352.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., & Kim, S. S. (2003). Enterobactin : An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3584-3588.

Bibliographie

- Recalcati, S., Minotti, G., & Cairo, G. (2010). Iron Regulatory Proteins : From Molecular Mechanisms to Drug Development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(10), 1593-1616.
- Rees, D. C. (2002). Great Metalloclusters in Enzymology. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 221-246.
- Rees, D. C., & Howard, J. B. (2003). The Interface Between the Biological and Inorganic Worlds : Iron-Sulfur Metalloclusters. *Science*, 300(5621), 929-931.
- Richardson, D. R., Lane, D. J. R., Becker, E. M., Huang, M. L.-H., Whitnall, M., Rahmanto, Y. S., Sheftel, A. D., & Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 10775-10782.
- Riedel, S., Siemiatkowska, B., Watanabe, M., Müller, C. S., Schünemann, V., Hoefgen, R., & Leimkühler, S. (2019). The ABCB7-Like Transporter PexA in *Rhodobacter capsulatus* Is Involved in the Translocation of Reactive Sulfur Species. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Rishi, G., Wallace, D. F., & Subramaniam, V. N. (2015). Hepcidin : Regulation of the master iron regulator. *Bioscience Reports*, 35(3), e00192.
- Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Choudens, S. O. de, Barras, F., & Py, B. (2015). Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism. *PLOS Genetics*, 11(5), e1005134.
- Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., & Barras, F. (2013). Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes : Formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827(3), 455-469.
- Roche, B., Huguenot, A., Barras, F., & Py, B. (2015). The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 95(4), 605-623.
- Rodríguez-Manzanegue, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., & Herrero, E. (1999). Grx5 Glutaredoxin Plays a Central Role in Protection against Protein Oxidative Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 8180-8190.
- Rodríguez-Manzanegue, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., & Herrero, E. (2002). Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1109-1121.
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Munnich, A., & Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics*, 17, 215-217.
- Rouault, T. A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology*, 2(8), 406-414.
- Rouault, T. A. (2015). Mammalian iron-sulphur proteins : Novel insights into biogenesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(1), 45-55.
- Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.-K., Hirasawa, M., Gualberto, J. M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D. B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M. K., & Jacquot, J.-P. (2007). Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7379-7384.
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M. K. & Jacquot, J. P. (2010). Glutaredoxins : roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci.*, 35(1), 43-52.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J. R., & White, M. F. (2006). The DNA Repair Helicases XPD and FancJ Have Essential Iron-Sulfur Domains. *Molecular Cell*, 23(6), 801-808.

Bibliographie

Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, 86(2), 583-650.

Salahudeen, A. A., Thompson, J. W., Ruiz, J. C., Ma, H.-W., Kinch, L. N., Li, Q., Grishin, N. V., & Bruick, R. K. (2009). An E3 Ligase Possessing an Iron-Responsive Hemerythrin Domain Is a Regulator of Iron Homeostasis. *Science*, 326(5953), 722-726.

Santambrogio, P., Biasiotto, G., Sanvito, F., Olivieri, S., Arosio, P., & Levi, S. (2007). Mitochondrial Ferritin Expression in Adult Mouse Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(11), 1129-1137.

Santana-Codina, N., & Mancias, J. D. (2018). The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Health and Disease. *Pharmaceuticals*, 11(4), 114.

Sazanov, L. A. & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311(5766), 1430-1436.

Schaedler, T. A., Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A. J., Veen, H. W. van, & Balk, J. (2014). A Conserved Mitochondrial ATP-binding Cassette Transporter Exports Glutathione Polysulfide for Cytosolic Metal Cofactor Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23264-23274.

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., & Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10206-10211.

Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., & Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 17(22), 3521-3531.

Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., & Puccio, H. (2011). Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/ NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS ONE*, 6(1), 1-12.

Schneider, C., Groß, S. J., Demeshko, S., Bontemps, S., Meyer, F., & Werncke, C. G. (2021). Synthesis and characterisation of a very low-coordinate diferrous [2Fe-2S]⁰ unit. *Chemical Communications*, 57(82), 10751-10754.

Schoenfeld, R. A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A. R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M., Puccio, H., & Cortopassi, G. A. (2005). Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Human Molecular Genetics*, 14(24), 3787-3799.

Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A., & Kiley, P. J. (2000). The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9009-9014.

Scott, T. A., Berlinguette, C. P., Holm, R. H., & Zhou, H.-C. (2005). Initial synthesis and structure of an all-ferrous analogue of the fully reduced [Fe₄S₄] cluster of the nitrogenase iron protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28), 9741-9744.

Seguin, A., Sutak, R., Bulteau, A.-L., Garcia-Serres, R., Oddou, J.-L., Lefevre, S., Santos, R., Dancis, A., Camadro, J.-M., Latour, J.-M., & Lesuisse, E. (2010). Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802(6), 531-538.

Bibliographie

- Seki, M., Takeda, Y., Iwai, K., & Tanaka, K. (2013). IOP1 Protein Is an External Component of the Human Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly (CIA) Machinery and Functions in the MMS19 Protein-dependent CIA Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16680-16689.
- Shaw, G. C., Cope, J. J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G. E., Gwynn, B., Lambert, A. J., Wingert, R. A., Traver, D., Trede, N. S., Barut, B. A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M. J., Peters, L. L., ... Paw, B. H. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, 440(7080), 96-100.
- Sheftel, A. D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O. S., & Ponka, P. (2007). Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*, 110(1), 125-132.
- Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Elsässer, H.-P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., & Lill, R. (2010). 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*, 107(26), 11775-11780.
- Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Kerscher, S., Elsässer, H. P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U. & Lill, R. (2009). Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I. *Molecular and Cellular Biology*, 29(22), 6059-6073.
- Shi, H., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., & Philpott, C. C. (2008). A Cytosolic Iron Chaperone That Delivers Iron to Ferritin. *Science*, 320, 5.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Matte, A., Armengod, M. E., & Cygler, M. (2010). Structural Basis for Fe–S Cluster Assembly and tRNA Thiolation Mediated by IscS Protein–Protein Interactions. *PLoS Biology*, 8(4), 18.
- Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. (2007). Characterization and Crystallization of an IscU-type Scaffold Protein with Bound [2Fe–2S] Cluster from the Hyperthermophile, Aquifex aeolicus. *Journal of Biochemistry*, 142(5), 577,582.
- Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2008). The Asymmetric Trimeric Architecture of [2Fe–2S] IscU: Implications for Its Scaffolding during Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 383(1), 133-143.
- Silberg, J. J., Hoff, K. G., Tapley, T. L., & Vickery, L. E. (2001). The Fe/S Assembly Protein IscU Behaves as a Substrate for the Molecular Chaperone Hsc66 from Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1696-1700.
- Slinker, J. D., Muren, N. B., Renfrew, S. E., & Barton, J. K. (2011). DNA charge transport over 34 nm. *Nature Chemistry*, 3(3), 228-233.
- Smith, A. D., Agar, J. N., Johnson, K. A., Frazzon, J., Amster, I. J., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (2001). Sulfur Transfer from IscS to IscU: The first Step in Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 11103-11104.
- Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R., & Johnson, M. K. (2005). Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Letters*, 579(23), 5236-5240.
- Smith, A. T., Linkous, R. O., Max, N. J., Sestok, A. E., Szalai, V. A. & Chacon, K. N. (2019). The FeoC [4Fe-4S] cluster is redox-active and rapidly oxygen-sensitive. *Biochemistry*, 58, 4935-4949.
- Sontz, P. A., Mui, T. P., Fuss, J. O., Tainer, J. A., & Barton, J. K. (2012). DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 1856-1861.

Bibliographie

- Spiegel, R., Saada, A., Halvardson, J., Soiferman, D., Shaag, A., Edvardson, S., Horovitz, Y., Khayat, M., Shalev, S. A., Feuk, L. & Elpeleg, O. (2014). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Journal of Human Genetics*, 22, 902-906..
- Srinivasan, V., Netz, D. J. A., Webert, H., Mascarenhas, J., Pierik, A. J., Michel, H., & Lill, R. (2007). Structure of the Yeast WD40 Domain Protein Cia1, a Component Acting Late in Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Structure*, 15(10), 1246-1257.
- Srinivasan, V., Pierik, A. J., & Lill, R. (2014). Crystal Structures of Nucleotide-Free and Glutathione-Bound Mitochondrial ABC Transporter Atm1. *Science*, 343(6175), 1137-1140.
- Srouf, B., Gervason, S., Monfort, B., & D'Autr aux, B. (2020). Mechanism of Iron-Sulfur Cluster Assembly : In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter. *Inorganics*, 8(10), 55.
- Stehling, O., Mascarenhas, J., Vashisht, A. A., Sheftel, A. D., Niggemeyer, B., R sser, R., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A., & Lill, R. (2013). Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B Integrate Iron Homeostasis and Maturation of Different Subsets of Cytosolic-Nuclear Iron-Sulfur Proteins. *Cell Metabolism*, 18(2), 187-198.
- Stehling, O., Netz, D. J. A., Niggemeyer, B., R sser, R., Eisenstein, R. S., Puccio, H., Pierik, A. J., & Lill, R. (2008). Human Nbp35 Is Essential for both Cytosolic Iron-Sulfur Protein Assembly and Iron Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), 5517-5528.
- Stehling, O., Vashisht, A. A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z. O., Sharma, T., Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A., & Lill, R. (2012). MMS19 Assembles Iron-Sulfur Proteins Required for DNA Metabolism and Genomic Integrity. *Science*, 337(6091), 195-199.
- Stuible, H. P., Meier, S., Wagner, C., Hannappel, E. & Schweizer, E. (1998). A Novel Phosphopantetheine:Protein Transferase Activating Yeast Mitochondrial Acyl Carrier Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 22334-22339.
- T**agawa, K., & Arnon, D. I. (1962). Ferredoxins as Electron Carriers in Photosynthesis and in the Biological Production and Consumption of Hydrogen Gas. *Nature*, 195(4841), 537-543.
- Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002). A Third Bacterial System for the Assembly of Iron-Sulfur Clusters with Homologs in Archaea and Plastids. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 28380-28383.
- Terzi, E. M., Sviderskiy, V. O., Alvarez, S. W., Whiten, G. C., & Possemato, R. (2021). Iron-sulfur cluster deficiency can be sensed by IRP2 and regulates iron homeostasis and sensitivity to ferroptosis independent of IRP1 and FBXL5. *Science Advances*, 7(22), eabg4302.
- Tokumoto, U., Nomura, S., Mihara, Y. M. H., Kato, S., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., & Takahasbi, Y. (2002). Network of Protein-Protein Interactions among Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins in Escherichia coli. *Journal of Biochemistry*, 131(5), 713-719.
- Tokumoto, U., & Takahashi, Y. (2001). Genetic Analysis of the isc Operon in Escherichia coli Involved in the Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins. *Journal of Biochemistry*, 130(1), 63-71.
- Trotter, V., Vinella, D., Loiseau, L., Choudens, S. O. D., Fontecave, M., & Barras, F. (2009). The CsdA cysteine desulphurase promotes Fe/S biogenesis by recruiting Suf components and participates to a new sulphur transfer pathway by recruiting CsdL (ex-YgdL), a ubiquitin-modifying-like protein. *Molecular Microbiology*, 74(6), 1527-1542.
- Tsai, C.-L., & Barondeau, D. P. (2010). Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe-S Cluster Biosynthetic Complex. *Biochemistry*, 49(43), 9132-9139.

Bibliographie

Tsai, C.-L., Bridwell-Rabb, J., & Barondeau, D. P. (2011). Friedreich's Ataxia Variants I154F and W155R Diminish Frataxin-Based Activation of the Iron-Sulfur Cluster Assembly Complex. *Biochemistry*, 50, 6478-6487.

Tucker, N. P., D'Autréaux, B., Yousafzai, F. K., Fairhurst, S. A., Spiro, S., & Dixon, R. (2008). Analysis of the Nitric Oxide-sensing Non-heme Iron Center in the NorR Regulatory Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 908-918.

Urbina, H. D., Silberg, J. J., Hoff, K. G., & Vickery, L. E. (2001). Transfer of Sulfur from IscS to IscU during Fe/S Cluster Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44521-44526.

Uzarska, M. A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlhoff, U., & Rouhier, N. (2018). Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1865(9), 1250-1259.

Van Vranken, J. G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S. P., Winge, D. R., & Rutter, J. (2016). The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife*, 5, e17828.

Van Vranken, J. G., Nowinski, S. M., Clowers, K. J., Jeong, M.-Y., Ouyang, Y., Berg, J. A., Gygi, J. P., Gygi, S. P., Winge, D. R., & Rutter, J. (2018). ACP Acylation Is an Acetyl-CoA-Dependent Modification Required for Electron Transport Chain Assembly. *Molecular Cell*, 71(4), 567-580.e4.

Vashisht, A. A., Zumbrennen, K. B., Huang, X., Powers, D. N., Durazo, A., Sun, D., Bhaskaran, N., Persson, A., Uhlen, M., Sangfelt, O., Spruck, C., Leibold, E. A., & Wohlschlegel, J. A. (2009). Control of Iron Homeostasis by an Iron-Regulated Ubiquitin Ligase. *Science*, 326(5953), 718-721.

Veiga, N., Torres, J., Mansell, D., Freeman, S., Domínguez, S., Barker, C. J., Díaz, A., & Kremer, C. (2009). "Chelatable iron pool": Inositol 1,2,3-trisphosphate fulfils the conditions required to be a safe cellular iron ligand. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(1), 51-59.

Vernis, L., Facca, C., Delagoutte, E., Soler, N., Chanet, R., Guiard, B., Faye, G., & Baldacci, G. (2009). A Newly Identified Essential Complex, Dre2-Tah18, Controls Mitochondria Integrity and Cell Death after Oxidative Stress in Yeast. *PLoS ONE*, 4(2), e4376.

Vitale, G., Fabre, E., & Hurt, E. C. (1996). NBP35 encodes an essential and evolutionary conserved protein in *Saccharomyces cerevisiae* with homology to a superfamily of bacterial ATPases. *Gene*, 178(1-2), 97-106.

Vivas, E., Skovran, E., & Downs, D. M. (2006). *Salmonella enterica* Strains Lacking the Frataxin Homolog CyaY Show Defects in Fe-S Cluster Metabolism In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1175-1179.

Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C., & Volz, K. (2006). Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science*, 314(5807), 1903-1908.

Wallander, M. L., Leibold, E. A., & Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763(7), 668-689.

Wang, J., Chen, G., Muckenthaler, M., Galy, B., Hentze, M. W., & Pantopoulos, K. (2004). Iron-Mediated Degradation of IRP2, an Unexpected Pathway Involving a 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), 954-965.

Bibliographie

- Wang, J., & Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*, 434(3), 365-381.
- Wang, H., Shi, H., Rajan, M., Canarie, E. R., Hong, S., Simoneschi, D., Pagano, M., Bush, M. F., Stoll, S., Leibold, E. A. & Zheng, N. (2020). FBXL5 Regulates IRP2 Stability in Iron Homeostasis via an Oxygen-Responsive [2Fe2S] Cluster. *Molecular Cell*, 78, 31-41.
- Wang, W., Huang, H., Tan, G., Si, F., Liu, M., Landry, A. P., Lu, J., & Ding, H. (2010). In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron–sulfur cluster assembly protein IscA in Escherichia coli. *Journal of Biochemistry*, 432, 429-436.
- Weaver, J., & Pollack, S. (1989). Low-Mr iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochemical Journal*, 261(3), 787-792.
- Webert, H., Freibert, S. V., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L. & Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nature Communication*, 5:5013.
- Weiler, B. D., Brück, M.-C., Kothe, I., Bill, E., Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2020). Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1–ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34), 20555-20565.
- West, A. R., & Oates, P. S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption : Current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology*, 14(26), 4101-4110.
- Wiedmann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Meisinger, C., Mühlenhoff, U., Lill, R. & Pfanner, N. (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron–sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO journal*, 25(1), 184-195.
- Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmidt, B., Paw, B. H., Shaw, G. C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J., & Zon, L. I. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature*, 436(7053), 1035-1039.
- Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J. M., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2010). Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: The SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *J. Biol. Chem*, 285, 23331-23341.
- Y**an, R., Adinolfi, S., & Pastore, A. (2015). Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron–sulfur cluster assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1854(9), 1113-1117.
- Yan, R., Kelly, G., & Pastore, A. (2014). The Scaffold Protein IscU Retains a Structured Conformation in the Fe-S Cluster Assembly Complex. *ChemBioChem*, 15(11), 1682-1686.
- Yan, R., Konarev, P. V., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S. R., Py, B., Barras, F., Svergun, D. I., & Pastore, A. (2013). Ferredoxin Competes with Bacterial Frataxin in Binding to the Desulfurase IscS. *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), 24777-24787.
- Yan, R., Friemel, M., Aloisi, C., Huynen, M., Taylor, I. A., Leimkühler, S., & Pastore, A. (2016). The Eukaryotic-Specific ISD11 Is a Complex-Orphan Protein with Ability to Bind the Prokaryotic IscS. *PLOS ONE*, 11(7).
- Yang, J., Goetz, D., Li, J.-Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., & Barasch, J. (2002). An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. *Molecular Cell*, 10(5), 1045-1056.

Bibliographie

Yoon, H., Knight, S. A. B., Pandey, A., Pain, J., Turkarlan, S., Pain, D., & Dancis, A. (2015). Turning *Saccharomyces cerevisiae* into a Frataxin-Independent Organism. *PLOS Genetics*, 11(5), e1005135.

Yoon, T., & Cowan, J. A. (2003). Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. Characterization of Frataxin as an Iron Donor for Assembly of [2Fe-2S] Clusters in ISU-Type Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 6078-6084.

Yoon, T., & Cowan, J. A. (2004). Frataxin-mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25943-25946.

Zähringer, J., Baliga, B. S., & Munro, H. N. (1976). Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(3), 857-861.

Zhang, Y., Lyver, E. R., Nakamaru-Ogiso, E., Yoon, E., Amutha, B., Lee, D. W., Bi, E., Ohnishi, T., Daldal, F., Pain, D. & Dancis, A. (2008). Dre2, a Conserved Eukaryotic Fe/S Cluster Protein, Functions in Cytosolic Fe/S Protein Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), 5569-5582.

Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E. & Chasteen, N. D. (2002). Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 27689-27696.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., & Dean, D. R. (1998). Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13264-13272.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., & Dean, D. R. (1994). Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the nifS Gene Product. *Biochemistry*, 33(15), 4714-4720.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F., & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 2754-2758.

Zheng, L., Andrews, P. C., Hermodson, M. A., Dixon, J. E. & Zalkin, H. (1990). Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(5), 2814-2821.

Zühlke, C. H., Dalski, A., Habeck, M., Straube, K., Hedrich, K., Hoeltzenbein, M., Konstanzer, A., Hellenbroich, Y., & Schwinger, E. (2004). Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia : Detection of an exon deletion and novel missense mutations. *European Journal of Human Genetics*, 12(11), 979-982.

ANNEXE 1 Le dichroïsme circulaire

ANNEXE 1 Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) repose sur un phénomène physique d'absorption différentielle d'une lumière polarisée circulairement par une molécule chirale. Les molécules chirales n'absorbent pas de la lumière avec la même amplitude selon qu'elle est polarisée circulairement à gauche (PCG) ou à droite (PCD). Un signal de CD correspond à une différence d'absorption entre les lumières PCG et PCD qui va être mesurée par un spectrophotomètre CD :

$$(23) \Delta A = A_G - A_D$$

Cette différence d'absorbance est souvent rapportée en ellipticité θ exprimée en mdeg :

$$(24) \theta = 32,98 \times \Delta A$$

Cette expression d'ellipticité peut être reliée à la concentration molaire (C) de la molécule chirale, la différence du coefficient d'extinction molaire pour les lumières PCG et PDC ($\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$ en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) et l la longueur du chemin optique en cm:

$$(25) \theta = 32,98 \times \Delta \epsilon \times C \times l$$

Une bande positive dans le spectre obtenu par CD correspond à une absorption plus forte par la lumière PCG alors qu'une bande négative correspond à une absorption plus forte par la lumière PCD.

Dans notre cas, le centre métallique Fe^{2+} tétraédrique coordonné par 4 ligands au sein de la protéine échafaudage ISCU est chiral nous permettant d'utiliser cette technique de CD afin de mesurer LMCT. Par définition un LMCT implique la réduction du métal et l'oxydation des ligands. Lorsqu'un métal est coordonné par des ligands au sein d'une protéine, ces orbitales atomiques d sont divisées en énergie (**Figure 96**). Le transfert de charge se réalise par l'apport d'un électron provenant des orbitales moléculaires (σ , σ^* , π , π^*) des ligands vers les orbitales d du métal vide ou partiellement rempli. Dans le cas des transferts de charge entre un ligand cystéine (atome de soufre) et un ion Fe^{2+} , l'énergie de ces transitions correspond à la région du proche UV. L'énergie des LMCT impliquant des ligands plus électronégatifs comme l'oxygène O et l'azote N est plus élevée, elles sont généralement observées dans le domaine de l'UV lointain où d'autres transitions sont présentes impliquant des transitions entre les orbitales moléculaires de la chaîne polypeptidique de la protéine elle-même (σ , σ^* , π , π^*) qui masquent les LMCT. Par conséquent, d'autres techniques de spectroscopie sont nécessaires, notamment le MCD (magnetic circular dichroism) qui permet de détecter spécifiquement les transitions impliquant des métaux en raison de leurs propriétés paramagnétiques.

ANNEXE 1 Le dichroïsme circulaire

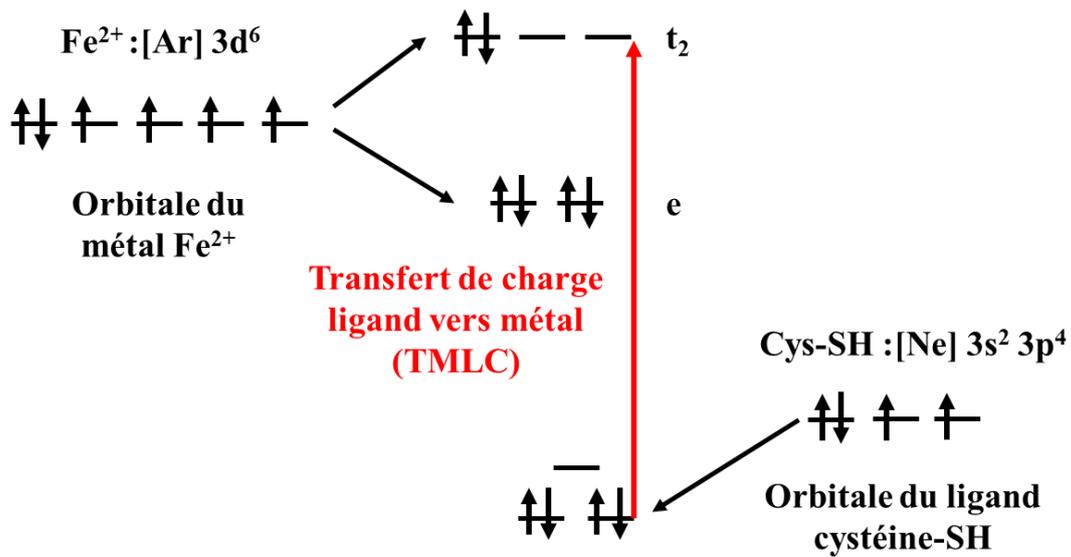


Figure 96 Schéma du diagramme des orbitales moléculaires entre le métal Fe^{2+} et un ligand cystéine. Lors d'une interaction entre le métal Fe^{2+} et ses ligands (ici un résidu cystéine), les orbitales d de Fe^{2+} sont déstabilisées et divisées en énergie alors que les orbitales du ligand (résidu cystéine) sont divisées et stabilisées. Le transfert de charge ligand vers métal LMCT (en rouge) est réalisé via le transfert d'un électron des orbitales moléculaires du ligand vers les orbitales d vides ou partiellement remplies du métal Fe^{2+} .

ANNEXE 2 La spectroscopie Mössbauer

La spectrométrie Mössbauer ou la résonance γ nucléaire permet d'observer l'absorption résonnante sans recul de photons γ . La spectrométrie Mössbauer est une spectrométrie nucléaire donnant des renseignements sur les noyaux affectés, comme par exemple la densité électronique, le moment magnétique et l'état vibrationnel des atomes.

Dans notre cas, ce phénomène de résonance γ nucléaire se produit quand un photon γ émis par un noyau de l'isotope radioactif ^{57}Co lors de sa désexcitation est absorbé par un noyau de fer présent dans l'échantillon préalablement enrichi en ^{57}Fe . Cette absorption permet l'excitation du noyau de ^{57}Fe passant de son état fondamental E_f à son état excité E_e . La source de photons γ du ^{57}Co émet une énergie constante. Cependant pour acquérir un spectre Mössbauer il faut moduler cette énergie par effet Doppler par la vibration de la source ^{57}Co afin d'obtenir une gamme d'énergie où les atomes de ^{57}Fe absorbent. On obtient alors un spectre Mössbauer correspondant à l'absorption du photon γ par les atomes de ^{57}Fe en fonction de la vitesse de vibration de la source exprimée en mm/s.

Deux paramètres intimement liés aux caractéristiques de l'atome de fer présent dans l'échantillon peuvent être déterminés : (1) l'interaction monopolaire électrique (déplacement isomérique) et (2) l'interaction quadripolaire électrique (écart quadrupolaire).

Le déplacement isomérique δ correspond à un décalage de l'énergie de transition (décalage des niveaux fondamental et excité) due à l'interaction entre la charge du noyau et la charge électronique de son environnement (**Figure 97**). Cette valeur est directement mesurée sur le spectre Mössbauer au niveau du barycentre des raies et est exprimée en mm/s. Une référence comme le fer métallique permet de calibrer l'échelle de déplacement isomérique. Ce paramètre permet de déterminer l'état d'oxydation et le spin de l'atome de fer ainsi que la nature de ces ligands (oxygène/azote/soufre). Ce déplacement isomérique est finement régulé et devient plus élevé lorsque : (1) le degré d'oxydation du fer est faible ; (2) lorsque son spin est élevé et (3) lorsque l'électronégativité des atomes liant le métal augmente, selon la série $\delta_{\text{O}} > \delta_{\text{N}} > \delta_{\text{S}}$ pour l'oxygène (O), l'azote (N) et le soufre (S), mais expérimentalement l'effet d'un oxygène est très difficile à distinguer de celui d'un azote.

L'écart quadrupolaire ΔE_Q correspond à la dégénérescence des niveaux de spin suite à la formation d'un gradient de champ électrique des électrons du noyau ^{57}Fe (**Figure 97**). L'état excité de spin 3/2 se divise en deux sous-niveaux d'énergie de spin 3/2 et 1/2. L'écart entre ces deux niveaux d'énergie permet de calculer l'écart quadrupolaire et est directement déterminé sur le spectre Mössbauer en mesurant l'écart entre le doublet exprimé en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Ce paramètre fournit des informations sur la symétrie et la géométrie de l'atome de fer.

ANNEXE 2 La spectroscopie Mössbauer

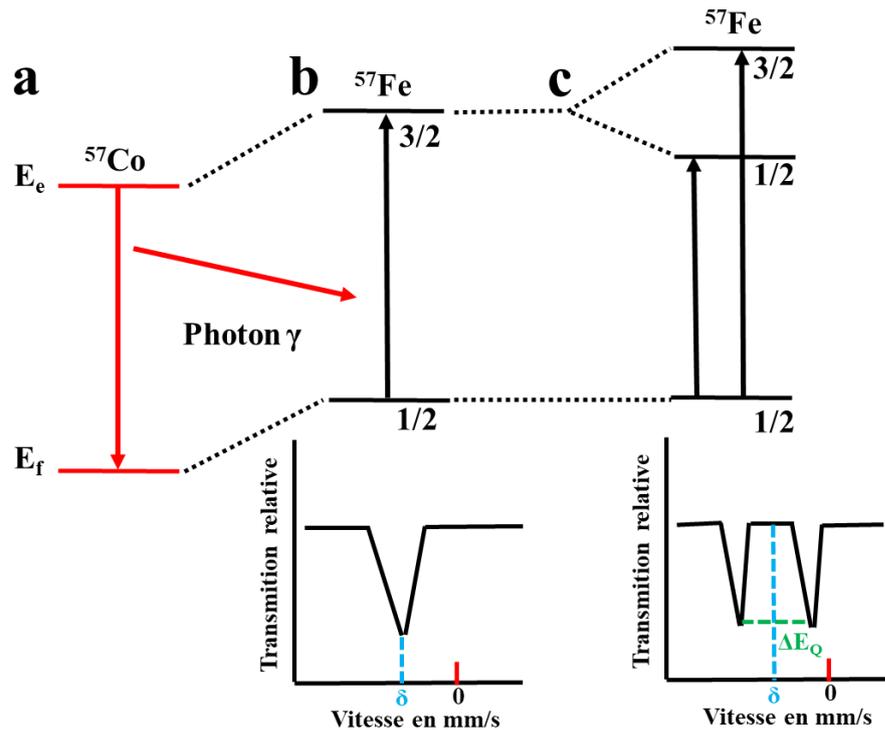


Figure 97 Représentation du déplacement chimique et de l'écart quadrupolaire durant une expérience de Mössbauer. (a) La désexcitation du noyau de l'isotope radioactif ^{57}Co émet un photon γ qui est absorbé par un atome de ^{57}Fe . (b) Le photon absorbé excite l'atome de ^{57}Fe passant d'un état fondamental E_f de spin $1/2$ à un état excité E_e de spin $3/2$. Un décalage entre l'état fondamental et excité permet de mesurer le déplacement isomérique. (c) Dégénérescence du spin $3/2$ en deux spins $1/2$ et $3/2$. Ces deux valeurs de spin correspondent aux deux raies du spectre et la mesure de leur distance d'écart correspond au paramètre de l'écart quadrupolaire.

Annexe 3 La spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN (**R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire) est une technique importante depuis plusieurs décennies dans le domaine de la biophysique des protéines. L'utilisation de la RMN durant ma thèse m'a permis dans un premier temps d'étudier les différentes conformations de la protéine échafaudage ISCU en présence d'atome de Zn ou de Fe²⁺ ou en absence de métal, et dans un second temps d'étudier les interactions entre les différentes protéines des complexes eucaryote et bactérien.

Sous l'action d'un champ magnétique B_0 les noyaux possédant des spins non nuls subissent une aimantation. Pour un spin $I = \frac{1}{2}$ possédant un rapport gyromagnétique γ peut prendre une position parallèle ou antiparallèle au champ magnétique B_0 . La différence d'énergie des deux populations est proportionnelle à la force du champ magnétique B_0 :

$$(26) \Delta E = \gamma B_0 \hbar$$

Avec $\hbar = h/2\pi$ la constante de Planck. Sous l'effet de ce champ magnétique B_0 les spins précessent autour du champ magnétique suivant un vecteur M le long de l'axe z à une fréquence appelée fréquence de Larmor :

$$(27) \nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$$

Pour obtenir le phénomène de résonance magnétique il est nécessaire d'appliquer une impulsion de radiofréquence B_1 perpendiculaire au champ magnétique B_0 et oscillant à une fréquence de Larmor ν_0 . Cette impulsion de radiofréquence B_1 permet de changer l'orientation du vecteur de précession M le long de l'axe x ou y . Lorsque cette impulsion est terminée, l'aimantation retourne à l'équilibre en précessant autour du champ magnétique B_0 suivant le vecteur M le long de l'axe z . Le retour à l'équilibre de l'aimantation permet de déterminer deux temps de relaxation : (1) un temps de relaxation longitudinal T_1 selon l'axe z qui représente le retour à l'équilibre thermodynamique et (2) un temps de relaxation transversal T_2 dans le plan xy qui représente la perte de cohérence des spins (**Figure 98**).

Lors de cette mesure on obtient un signal sinusoïdal décroissant appelé signal de procession libre qui représente le phénomène de relaxation T_2 au cours du temps. Une transformée de Fourier permet de passer d'un signal de procession libre (temporel) à un spectre dans le domaine des fréquences. Chaque pic du spectre 1D de RMN correspond à une fréquence de Larmor différente rendant compte de l'environnement électronique de chaque noyau de l'échantillon (noyau hydrogène). Bien que ces différentes fréquences de Larmor soient petites, elles sont détectables en spectroscopie RMN. Chaque fréquence de Larmor d'un noyau correspond à un déplacement chimique δ exprimé en parties par millions (ppm).

Annexe 3 La spectroscopie RMN

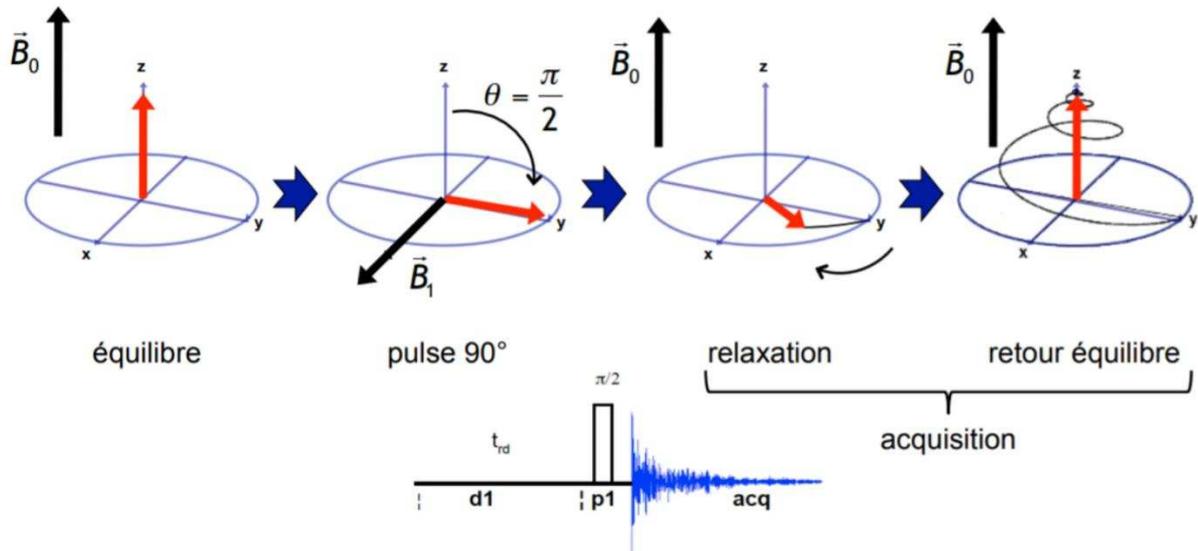


Figure 98 Représentation d'une expérience de spectroscopie RMN 1D. Un champ magnétique B_0 permet d'aimanter les noyaux possédant des spins non nuls de façon parallèle ou antiparallèle à lui. Ces spins précessent autour de B_0 suivant le vecteur M (flèche rouge) selon l'axe z . Une impulsion radiofréquence B_1 permet de changer l'orientation de l'aimantation suivant le vecteur M selon l'axe x ou y . Lorsque cette impulsion radiofréquence est terminée, un temps de relaxation T_2 est mesuré correspondant au déphasage des spins dans le plan $y-x$ due aux interactions avec d'autres spins (perte de cohérence). Cette mesure est représentée par un signal sinusoïdal décroissant au cours du temps (signal de procession libre). Une transformée de Fourier de ce signal permet d'obtenir un spectre RMN dans le domaine des fréquences.

Le temps de relaxation T_2 est dépendant de la taille de la protéine étudiée. En effet, une petite protéine ($< 30\ 000$ Da) est caractérisée par un temps de relaxation T_2 lent permettant d'obtenir des signaux fins. Cependant une grosse protéine ($> 50\ 000$ Da) est caractérisée par un temps de relaxation T_2 rapide engendrant un élargissement des signaux difficilement détectable. Cette spécificité de la spectroscopie RMN 1D m'a permis de visualiser des interactions entre protéine et grand complexe.

La spectroscopie RMN 2D permet de corrélérer les fréquences de différents noyaux tels que $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ ou $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Uniquement la spectroscopie RMN 2D HSQC $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation spectroscopy) et sa variante SOFAST-HMQC seront développées. La principale différence des spectroscopies RMN 2D par rapport à la spectroscopie RMN 1D est l'étape d'évolution où le temps t_1 de l'impulsion radiofréquence B_1 est incrémenté à chaque acquisition. 2 transformées de Fourier sont nécessaires pour obtenir un spectre en deux dimensions représenté sous la forme d'une carte 2D comportant des « taches » correspondant à un couplage entre un atome ^1H et un atome ^{15}N . Les spectres HSQC ou SOFAST-HMQC $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ sont considérés comme des empreintes digitales des protéines. En effet, on obtient un signal pour chaque acide aminé excepté pour la proline car les signaux amides sont invisibles. Cette empreinte digitale permet l'obtention d'informations sur le repliement de la protéine, son état d'oligomérisation ou encore l'ordre ou le désordre présent dans la protéine. En effet, des signaux

Annexe 3 La spectroscopie RMN

homogènes et disperses dans une large gamme de déplacement chimique de 6,5 à 11 correspond à une protéine bien repliée. A l'inverse, des signaux superposés et faiblement disperses dans une courte gamme de déplacement chimique entre 7 et 8,5 correspond à une protéine mal repliée. La spectroscopie RMN SOFAST-HMQC ^1H - ^{15}N m'a permis d'étudier les différents états de repliement de ISCU sous sa forme apo, Zn et Fe^{2+} .

Annexe 4 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique capable de déterminer de manière très précise la masse moléculaire des protéines analysées, en condition dénaturante mais plus récemment en condition native, permettant de mettre en avant la formation de complexes ou de révéler des espèces transitoires. Le principe de cette technique réside sur la séparation en phase gazeuse d'ions en fonction du rapport masse sur charge m/z . Un spectromètre de masse comporte 3 éléments essentiels : (1) une source d'ionisation des molécules ; (2) un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z ; (3) un détecteur pour mesurer les ions.

Plusieurs méthodes d'ionisation des molécules ont été développées et uniquement la technique d'ionisation par electrospray utilisée durant ma thèse sera décrite. La solution protéique est injectée dans la source d'ionisation à travers un micro-capillaire métallique. Sous l'effet d'un champ électrique, la solution protéique est vaporisée en fine gouttelette chargée positivement. L'énergie thermique produite par le champ électrique permet l'évaporation des molécules de solvant réduisant progressivement la taille des gouttelettes jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte. Cette limite de Rayleigh correspond au moment où les charges de répulsion électrostatiques sont égales aux charges de surface. Par fission coulombienne, ces gouttelettes éclatent donnant naissance à de très petites microgouttelettes portant un nombre de charges positives variable. Ces microgouttelettes sont transportées et focalisées à l'aide d'un réseau de lentille sous vide permettant aux ions de passer l'analyseur. Le spectromètre utilisé par nos collaborateurs possède un analyseur appelé Q-TOF. Il est composé d'un premier analyseur quadripolaire permettant la mesure du rapport masse sur charge m/z en passant les ions à travers un champ électrostatique. Le second analyseur appelé analyseur à temps de vol mesure le rapport m/z par la séparation des ions dans le temps en fonction de leur vitesse à la suite du passage des ions à travers un vide poussé. Le détecteur permet de transformer les ions en signal électrique et d'amplifier ce signal pour être traité informatiquement.

Annexe 5 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La spectroscopie RPE mesure l'absorption de la lumière des micro-ondes qui induit un renversement de spin des électrons, tout comme la spectroscopie RMN mesure l'absorption des ondes radio qui entraîne des renversements de spin nucléaire. La fréquence de la lumière qui induit ces renversements de spin est un diagnostic de la structure magnétique de la molécule. La structure magnétique est un indicateur sensible de la structure géométrique du métal. Ainsi, des événements tels que les changements de conformation ou une modulation de la sphère de première coordination par mutagenèse dirigée peuvent être suivis en observant les changements dans le spectre RPE.

L'électron est une particule rotative chargée possédant un champ magnétique qui le fait apparaître comme un aimant. Dans les cas des électrons non appariés, les niveaux d'énergie de spin sont dégénérés et les électrons tournent de façon aléatoire. Sous l'action d'un champ magnétique externe B_0 , les niveaux d'énergie de spin se divisent. Les électrons tournent soit dans le sens du champ magnétique, soit dans le sens opposé (**Figure 99**). Les électrons étant des particules avec un spin $1/2$, les électrons qui tournent dans le sens du champ magnétique ont un spin $-1/2$ et les électrons tournant dans le sens opposé ont un spin $+1/2$.

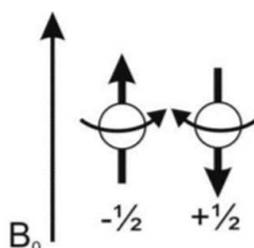


Figure 99 Orientation des électrons sous l'action d'un champ magnétique externe B_0 .

La division des niveaux d'énergie de spin est couplée à une différence d'énergie (ΔE). Lorsque l'énergie du photon incident ($h\nu$) correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie, certains électrons sont excités dans le niveau d'énergie supérieur et inversent la direction de leur spin. Durant le temps de relaxation, les électrons excités retournent à leur état d'origine en émettant des photons dont l'énergie est égale à ΔE (**Figure 100**). Un tel processus est exprimé par la formule suivante:

$$(28) \Delta E = h\nu = g\beta B_0$$

Où β est le magnéton de Bohr et g le facteur de Landé qui vaut 2,0023 pour l'électron libre et B_0 le champ magnétique. Pour induire une transition entre les niveaux d'énergie, l'électron doit absorber un quanta d'énergie $h\nu$.

Annexe 5 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

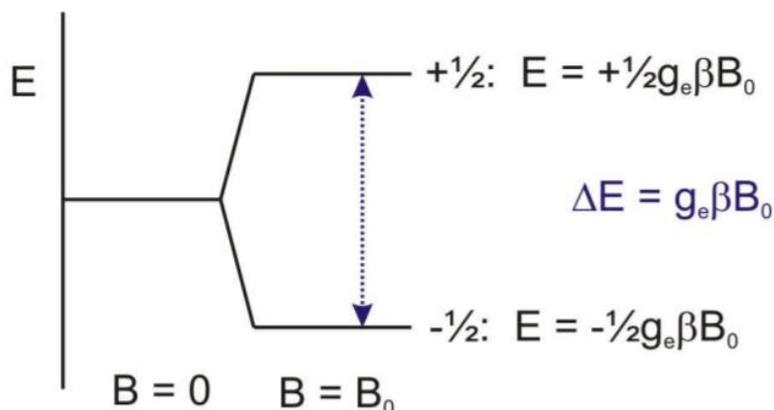


Figure 100 Induction des énergies des états de spin en fonction du champ magnétique B_0 .

Le paramètre essentiel obtenu par spectroscopie RPE est le facteur de Landé g qui va permettre de déterminer la composition, la structure et l'environnement du centre paramagnétique. Dans un spectromètre RPE, un échantillon paramagnétique est placé dans un grand champ magnétique uniforme qui, comme nous l'avons montré ci-dessus, divise les niveaux d'énergie de l'état fondamental d'une quantité ΔE où : $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$. Comme β et h sont des constantes ($9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J.G}^{-1}$ et $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$ respectivement) et que la magnitude de B_0 peut être mesurée, il est donc nécessaire pour calculer le facteur de Landé g de déterminer la valeur de ΔE , l'énergie entre les deux niveaux de spin. Pour ce faire, on irradie l'échantillon avec des micro-ondes à une fréquence déterminée et on balaie le champ magnétique. L'absorption des énergies se produira lorsque la condition de l'équation (6) sera satisfaite. La valeur de g peut alors être calculée à partir de ν (en GHz) et B_0 (en gauss) en utilisant :

$$(29) \quad g = \frac{h\nu}{\beta B_0}$$

Annexe 6 Revue: Mechanism of Iron–Sulfur Cluster Assembly: In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter

Annexe 6 Revue: Mechanism of Iron–Sulfur Cluster Assembly: In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter

Review

Mechanism of Iron–Sulfur Cluster Assembly: In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter

Batoul Srour, Sylvain Gervason, Beata Monfort and Benoit D’Autréaux * 

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France; Batoul.srour@i2bc.paris-saclay.fr (B.S.); Sylvain.GERVASON@i2bc.paris-saclay.fr (S.G.); beata.monfort@i2bc.paris-saclay.fr (B.M.)

* Correspondence: benoit.dautreaux@i2bc.paris-saclay.fr

Received: 18 July 2020; Accepted: 30 September 2020; Published: 3 October 2020



Abstract: Iron–sulfur (Fe–S) clusters are protein cofactors of a multitude of enzymes performing essential biological functions. Specialized multi-protein machineries present in all types of organisms support their biosynthesis. These machineries encompass a scaffold protein on which Fe–S clusters are assembled and a cysteine desulfurase that provides sulfur in the form of a persulfide. The sulfide ions are produced by reductive cleavage of the persulfide, which involves specific reductase systems. Several other components are required for Fe–S biosynthesis, including frataxin, a key protein of controversial function and accessory components for insertion of Fe–S clusters in client proteins. Fe–S cluster biosynthesis is thought to rely on concerted and carefully orchestrated processes. However, the elucidation of the mechanisms of their assembly has remained a challenging task due to the biochemical versatility of iron and sulfur and the relative instability of Fe–S clusters. Nonetheless, significant progresses have been achieved in the past years, using biochemical, spectroscopic and structural approaches with reconstituted system *in vitro*. In this paper, we review the most recent advances on the mechanism of assembly for the founding member of the Fe–S cluster family, the [2Fe2S] cluster that is the building block of all other Fe–S clusters. The aim is to provide a survey of the mechanisms of iron and sulfur insertion in the scaffold proteins by examining how these processes are coordinated, how sulfide is produced and how the dinuclear [2Fe2S] cluster is formed, keeping in mind the question of the physiological relevance of the reconstituted systems. We also cover the latest outcomes on the functional role of the controversial frataxin protein in Fe–S cluster biosynthesis.

Keywords: iron; sulfur; iron-sulfur cluster; persulfide; metallocofactor; ISC; SUF; NIF; frataxin; Friedreich’s ataxia

1. Introduction

Iron–sulfur (Fe–S) clusters are small inorganic structures constituting the catalytic site of a multitude of enzymes. They are among the oldest biological cofactors on earth. Their antique role may date back to some four billion years ago, in the form of “Fe(Ni)–S” minerals catalyzing the first abiotic reactions at the origin of life [1–3]. Fe–S clusters then became integral part of living organisms to fulfil a wide range of biochemical reactions [4]. The use of Fe–S clusters by living organisms is now widespread among the prokaryotic, archaeal and eukaryotic worlds [5–9]. Even viruses use Fe–S proteins for their replication [10–12]. With 90 experimentally confirmed Fe–S cluster containing proteins and 60 based on predictions, about 7% of the proteins encoded by the genome of *Escherichia coli* are Fe–S proteins, which emphasizes the prominent roles of Fe–S clusters [13]. Fe–S clusters are composed of iron and sulfide ions, hold in specific protein-binding sites that ligate the iron ions usually via the thiolate of cysteines, but also the nitrogen of histidines and in some rare cases the nitrogen of arginines and oxygen of aspartates or serines [14–17]. The most common forms of Fe–S clusters are the [2Fe2S], [4Fe4S] and

[3Fe4S] clusters which are the building blocks for more complex Fe–S clusters present in enzymes such as nitrogenase, hybrid cluster protein and carbon monoxide dehydrogenase [18–20]. Their biochemical functions can be divided into five main classes: electron transfer, redox catalysis, non-redox catalysis, DNA/RNA binding and maturation of Fe–S cluster proteins [13]. These biochemical functions cover a wide range of biological roles, including ATP production, protein synthesis, oxidative-stress defense and maintenance of genome integrity [7,9,21].

Even though the structures of the elementary Fe–S clusters are relatively simple, these inorganic compounds are not assimilated from the local environment, probably due to their instability. Thereby, the use of Fe–S clusters was concomitant with the development of multi-protein machineries by living organisms to support their biosynthesis [6–9,22]. Four machineries have been identified across species: the NIF (nitrogen fixation), the ISC (iron–sulfur cluster), the SUF (sulfur mobilization) and the CIA (cytosolic iron–sulfur cluster assembly) machineries that each have specialized functions [6–9,22]. In addition, carriers and accessory proteins achieve transport and insertion of Fe–S clusters in dedicated client proteins [6,7]. In eukaryotes, more than 30 proteins are needed to perform their synthesis, transport and insertion [6]. However, only a small subset of these proteins is required for their synthesis, which includes a scaffold protein on which Fe–S clusters are assembled, a cysteine desulfurase providing sulfur in the form of a cysteine bound persulfide (Cys-SSH) and a reductase to reduce the persulfide into sulfide (Figure 1) [23–26]. In a second step, Fe–S clusters are transferred to recipient apo-proteins with assistance of dedicated chaperones and accessory proteins (Figure 1) [6,7,27,28].

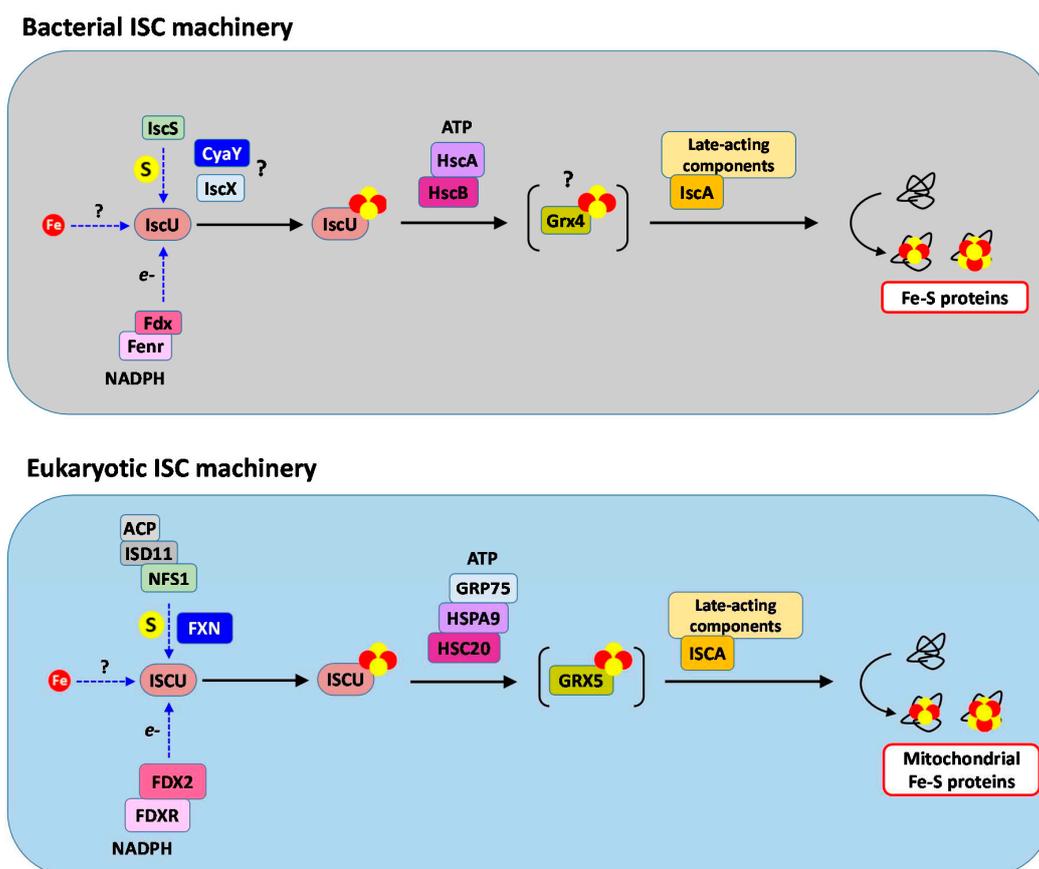


Figure 1. Main components of the bacterial and eukaryotic ISC machineries. The bacterial ISC machinery encompasses proteins encoded by the ISC operon (IscU, IscS, IscX, Fdx, HscA, HscB and IscA), as well

as CyaY, Fenr, Grx4 and several late-acting components. Fe–S clusters are assembled on the IscU scaffold; iron is provided to IscU by a still ill-defined iron chaperone; sulfur is provided by the cysteine desulfurase IscS, and its activity is modulated by CyaY and IscX; and electrons are provided by Fdx that is reduced by the flavodoxin/ferredoxin NADP reductase (Fenr). The [2Fe2S] cluster formed on IscU is transferred to late-acting components by the ATP-dependent chaperone/co-chaperone HscA/HscB. Grx4 may function as a relay to late-acting components among which is the IscA proteins that have specialized functions in the assembly of [4Fe4S] clusters and/or insertion of [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters into recipients' enzymes. In the eukaryotic ISC machinery, Fe–S clusters are assembled on the ISCU scaffold, iron is provided to ISCU by a still ill-defined iron chaperone, sulfur is provided by the cysteine desulfurase complex NFS1–ISD11–ACP, and electrons are provided by FDX2 that is reduced by the NADPH-dependent ferredoxin reductase FDXR. Binding of ISD11–ACP to NFS1 maintains NFS1 in a soluble form. FXN stimulates the whole process by acting on the sulfur donation step. The [2Fe2S] cluster formed on ISCU is transferred to late-acting components by the ATP-dependent chaperone/co-chaperone HSPA9/HSC20 with assistance from the nucleotide exchanger GRP75. GRX5 serves as a relay to late-acting components. The late-acting components, including ISCA, have specialized functions in the assembly of [4Fe4S] clusters and insertion of [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters into recipients' enzymes. The dashed blue arrows describe the supply of each element needed to build a Fe–S cluster (iron, sulfur and electrons) and the proteins involved at these steps, without assumption on the sequence order and coordination between these singular steps. The solid black arrows describe actual sequence for Fe–S cluster biogenesis and transfer.

Despite huge progresses in the past 30 years to identify all the components of the assembly machineries, a central question remains how Fe–S clusters are assembled. While iron–sulfur clusters can form spontaneously *in vitro* by mixing iron and sulfide ions in the presence of scaffolding molecules, the biological processes of their synthesis rely on tightly orchestrated reactions to coordinate iron and sulfur insertions in the scaffold proteins. In recent years, combinations of biochemical, spectroscopic, structural and computational approaches with *in vitro* reconstituted machineries have significantly contributed to the understanding of the mechanism of Fe–S cluster assembly and the specific role of each component of these machineries. Besides, handling these reconstituted systems is a major challenge as reconstituted system can generate free sulfide, which contributes to Fe–S cluster formation *in vitro*. This process is not expected to be productive of Fe–S clusters *in vivo* as the sulfide ions can freely diffuse outside of the biosynthetic complexes. Moreover, iron can bind non-specifically to proteins thereby masking specific iron-binding sites. An additional level of complexity arises with the formation of the [4Fe4S] clusters. The current view is that [4Fe4S] clusters are synthesized by reductive coupling of two [2Fe2S] clusters, thus that the [2Fe2S] cluster is the elementary building block of all Fe–S clusters in the cell [6,25,29–33].

This review focuses on the subset of proteins that ensure the biosynthesis of the [2Fe2S] cluster, with a special emphasis on the questions of the synchronization of iron and sulfur supplies to the scaffold proteins, how persulfide is reduced into sulfide and the mechanism of nucleation of iron and sulfide ions leading to formation of the dinuclear [2Fe2S] center. We also review the latest data on the role of the frataxin protein, a key protein in the Fe–S cluster assembly process, the function of which has remained controversial until very recently.

2. Overview of the Fe–S Cluster Assembly Machineries

The NIF system was the first multi-protein machinery to be discovered, in the late 1980s, by Denis Dean's group [34–36]. In nitrogen-fixing bacteria, this machinery is dedicated to the biosynthesis of the M/V and P clusters of the nitrogenase enzyme [18,34–38]. This machinery encompasses two main components, NifU, the scaffold protein and NifS, a cysteine desulfurase that is the source of sulfur [35,36]. Cysteine desulfurases convert the sulfur from the amino acid L-cysteine into a cysteine bound persulfide intermediate (Cys-SSH) that is a source of sulfide ions upon reductive cleavage of its S–S bond. The discovery of cysteine desulfurase was a major advance since this mechanism now

appears as a universal mode of sulfur delivery, not only for Fe–S clusters, but also for the production of a wide variety of sulfur containing biomolecules such as thiolated tRNA, thiamine and Moco [39,40].

In early 1990s, the ISC and SUF machineries were identified as the general providers of Fe–S clusters in most organisms, with the exception of some non-nitrogen fixing bacteria that lack the ISC and SUF machineries, in which the NIF machinery is the general source of Fe–S clusters [5,6,8,9,41–46]. Genome wide analysis show that the occurrence of the SUF system is much higher than the ISC one in bacteria and archaea, thus that the SUF system is the housekeeping assembly machinery in these organisms [47]. In contrast, nearly all eukaryotic organisms rely exclusively on the ISC system that was acquired from bacteria upon endosymbiosis [48], with the exception of plants that rely on both, the ISC and SUF systems [49,50]. In bacteria that encodes both the ISC and SUF machineries, the SUF machinery is expressed under oxidative-stress and iron-deprivation conditions, and in plants, it is expressed in the chloroplast, a compartment that is more exposed to oxidative conditions [8,45]. The underlying reason is that the SUF machinery is more resistant to oxidative stress [51] and handles iron apparently in a more efficient way than the ISC machinery. This raises important questions on the features of the mechanisms of Fe–S cluster assembly that provide such specificities to the ISC and SUF machineries. Some bacteria also express an incomplete machinery, the CSD (cysteine sulfinase) system that includes only two components: the cysteine desulfurase CsdA and the sulfur acceptor CsdE that are homologous to the SufS and SufE components of the SUF machinery [9]. The CSD machinery apparently participates to Fe–S cluster biosynthesis by providing sulfur to the SUF machinery [52].

The CIA machinery is present in the cytoplasm of eukaryotic organisms, and in contrast to the other machineries, is not autonomous for sulfur acquisition. Although the cysteine desulfurase of the ISC machinery, NFS1, is also present in the cytoplasm, albeit at very low concentrations, it does not provide sulfur to the CIA machinery [53–56]. Instead, the CIA machinery uses a, as of yet, not identified compound synthesized by the mitochondrial ISC machinery, either a sulfur containing molecule or a preassembled [2Fe2S] cluster [7,25,57]. It is thus unclear whether the CIA machinery is able to synthesize de novo the [2Fe2S] building block. Consequently, we do not cover this topic here.

3. Mechanism of Assembly by the ISC Core Machinery

In bacteria, the genes encoding the components of the machineries are organized in operons. In *E. coli*, the ISC operon encodes eight proteins: **IscU**, the scaffold protein, **IscS**, the cysteine desulfurase, **Fdx**, a [2Fe2S] cluster ferredoxin, **HscA** and **HscB**, a chaperone/co-chaperone system involved in the transfer of Fe–S cluster from IscU to acceptor proteins, **IscA**, a scaffold and/or carrier protein, **IscX**, a putative regulator of the activity of IscS and **IscR** a transcriptional regulator of the whole operon (Figure 1) [22]. Homologs of IscU, IscS, Fdx, IscA, HscA and HscB were later found in yeast, mammals and other organisms with major contributions from Roland Lill's lab to these discoveries (Table 1) [6]. Thereafter, the nomenclature of the protein names of each species is used to describe particular experiments and a double nomenclature bacteria/mammal for more general considerations. Among the proteins of the ISC machinery, **IscS/NFS1**, **IscU/ISCU** and **Fdx/FDX2** together form the core complex for the biosynthesis of [2Fe2S] clusters, while the **IscA/ISCA** proteins have specialized functions in the synthesis of [4Fe4S] clusters from [2Fe2S] clusters and/or transfer of Fe–S clusters (Table 1 and Figure 1) [29–32]. Additional proteins that are not encoded by the ISC operon are needed for the biosynthesis of Fe–S clusters. A flavin-dependent ferredoxin reductase (**Fenr/FDXR**) that uses electrons from NAD(P)H to reduce the [2Fe2S] cluster of Fdx/FDX2 (Table 1 and Figure 1). The frataxin protein (**CyaY/FXN**) is also important for efficient Fe–S cluster synthesis (Table 1, Figure 1) [58,59]. Its exact role is a matter of controversy that we discuss later on [58]. In eukaryotes, **ISD11**, a protein belonging to the LYRM (Leu–Tyr–Arg motif) family, and the acyl carrier proteins (**ACP**) together form a complex with NFS1. The role of the ISD11–ACP complex is incompletely understood, it apparently controls the stability of NFS1 in response to the level of acetyl-CoA [60].

Table 1. Corresponding names of the components of the iron–sulfur cluster (ISC) machinery and accessory proteins in prokaryotes, yeast and mammals.

Functional Role	Prokaryote	Yeast	Mammal
Mitochondrial iron transporter	-	Mrs3/4	MFRN1/2
U-type scaffold	IscU	Isu1/2	ISCU
Cysteine desulfurase	IscS	Nfs1	NFS1
Desulfurase-interacting protein 11	-	Isd11, Lyrm4	ISD11, LYRM4
Acyl carrier protein	ACP	ACP	ACP
Frataxin	CyaY	Yfh1	FXN
IscX	IscX	-	-
Ferredoxin	Fdx	Yah1	FDX2
Ferredoxin reductase	Ferr	Arh1	FDXR
Hsp70 chaperone	HscA	Ssq1	HSPA9
J-type co-chaperone	HscB	Jac1	HSC20
Nucleotide exchanger	-	Mge1	GRPE
Glutaredoxin	Grx4	Grx5	GRX5
A-type scaffold	IscA	Isa1/2	ISCA1/2
Late-acting components	-	Iba57	IBA57
	Bola	Bola1	BOLA1
	-	Bola3	BOLA3
	NfuA	Nfu1	NFU1
	Mrp	Ind1	IND1

3.1. Step 1: Iron Insertion

3.1.1. A Mononuclear Ferrous Iron-Binding Site in IscU/ISCU

IscU/ISCU is a small highly conserved protein of 15 kDa that was identified as the scaffold protein based on its ability to bind a labile [2Fe2S] cluster in vivo when co-expressed with all the other ISC components and in vitro in Fe–S cluster reconstitution assays with IscS/NFS1 [61–63]. Spectroscopic and structural studies of bacterial, archaeal and eukaryotic IscU/ISCU proteins have provided evidence that the [2Fe2S] cluster is ligated in an asymmetric arrangement by well-conserved amino acids: three cysteines and a non-cysteinylligand most likely an aspartate [23,61,62,64–66]. This assembly site was thus proposed to be the entry point for iron.

However, metal titrations and tri-dimensional structures revealed that IscU/ISCU proteins purified from bacterial cells do not contain iron in the assembly site but a zinc ion instead [23,67–72]. The zinc ion was found coordinated in an overall tetrahedral geometry by the well-conserved amino acids of the assembly site in *Haemophilus influenza* [71] and *Mus musculus* (PDB code 1WFZ) IscU and the identity of the ligands was also assessed in *E. coli*, mouse and human IscU/ISCU using site directed mutagenesis experiments (Figure 2A) [23,68,69] Here and thereafter, to ease comparison, the mouse sequence is used for amino acid numbering in IscU/ISCU proteins. In these proteins, the Zn²⁺ ion is coordinated by the two cysteines Cys35 and Cys61 that are also ligands of the [2Fe2S] cluster, and the histidine His103, but the fourth ligand seems exchangeable. While the aspartate Asp37 is the fourth ligand in the vast majority of cases, it is exchanged by the cysteine Cys104 in the crystal structure of IscU from *H. influenza* [71]. This suggests structural plasticity of the metal-binding site. Analysis by quantum and molecular mechanics indeed indicate that small rearrangements, such as protonation of the ligands, could induce a ligand swapping at the zinc site [69]. This structural plasticity would facilitate the accommodation of several metal and sulfide ions.

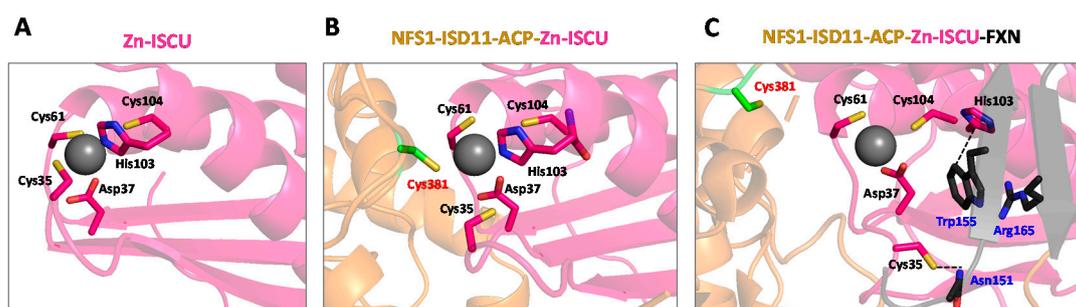


Figure 2. Structural rearrangement at the zinc site of ISCU upon binding of NFS1 and FXN. Zoom on the zinc site of (A) mouse ISCU (nuclear magnetic resonance (NMR) structure, PDB code 1WFZ) and in the human NFS1–ISD11–ACP–ISCU complex (B) without FXN (X-ray structure PDB code 5WLW) [67] and (C) with FXN (CryoEM structure PDB code 6NZU) [73]. ISCU and some of its key amino acids (Cys35, Asp37, Cys61 and His 103) are colored in pink, NFS1 is in yellow with its catalytic cysteine (Cys381) in green and FXN with its key amino acids (Asn151, Trp155 and Arg165) are in black. The dashed black line represents π staking between Trp155 and His103. The zinc ion is initially coordinated by Cys35, Asp37, Cys61 and His103 in ISCU. Upon binding to NFS1, the catalytic cysteine of NFS1, Cys381, binds to the zinc ion via exchange with Cys35. FXN binds to the NFS1–ISD11–ACP–ISCU complex and pushes aside His103 and Cys35 of ISCU via interactions with Trp155 and Asn151, respectively, thereby uncovering Cys104.

The plasticity of the IscU/ISCU protein also prevails at the level of its ternary structure and is directly connected to the metal-binding site. NMR studies revealed that IscU/ISCU exists in two inter-converting forms, a structured one and a de-structured one [69–71,74–76]. Interestingly, the coordination of the metal ion stabilizes the structured form. The ligands of the zinc ion belong to different parts of the protein: the cysteine Cys35 and the aspartate Asp37 are carried by a linker between two β -sheets, the cysteine Cys61 is at the tip of an α -helix and the histidine His103 along with the cysteine Cys104 are at the tip of another α -helix. Therefore, the coordination of the zinc ion connects distinct parts of the protein which stabilizes the ternary structure of the protein.

The first evidence suggesting that iron binds in the assembly site came from an NMR study on the *E. coli* IscU protein, which reported that incubation of apo-IscU with iron stabilizes the ordered form, as observed with zinc [77]. Our lab recently conducted an extensive study on mouse ISCU using several spectroscopic methods [23]. We found that the zinc ion hinders iron binding in the assembly site, but upon removal of the zinc ion, the monomeric form of ISCU binds Fe^{2+} in the assembly site. Site-directed mutagenesis identified Cys35, Asp37, Cys61 and His103 as the ligands of the iron center [23]. The Fe^{2+} ion thus adopts a similar arrangement as the Zn^{2+} ion in the assembly site of ISCU, which suggests interchangeable roles. Titration by circular dichroism (CD) indicated that ISCU binds a single Fe^{2+} ion and Mössbauer spectroscopies showed that it is a high spin Fe(II) center and confirmed the presence of several cysteines in the coordination sphere of the metal. Fe–S cluster assembly assays using the complete mouse ISC machinery with the NFS1–ISD11–ACP complex, FDX2 and FDXR show that iron-loaded ISCU (Fe–ISCU) is competent for Fe–S cluster assembly, while the zinc-loaded form (Zn–ISCU) is not, which indicates that binding of iron in the assembly site is the initial step in Fe–S cluster biosynthesis [23]. Binding of iron in the assembly site was later on reported with *E. coli* IscU upon removal of the zinc ion, which suggests that the first step in the mechanism of Fe–S cluster synthesis is conserved [78].

Surprisingly, the investigations of iron-binding sites in IscU/ISCU proteins from *E. coli*, human, drosophila and yeast by X-ray absorption spectroscopy (XAS) led to the conclusion that iron does not initially bind in the assembly site but in a 6-coordinated site comprising only nitrogen and oxygen [79–81]. A similar species was detected by Mössbauer spectroscopy when mouse apo-ISCU was incubated with one equivalent of iron, but this species represents a minor fraction of iron (15%) [23]. Experiments conducted with sub-stoichiometric amounts of iron showed that only the assembly site is

filled, thus that iron has a poor affinity for the putative secondary site. Moreover, reconstitution assays with ISCU containing iron exclusively in the assembly site showed that it is still fully competent for Fe–S cluster assembly, which rules out the idea that the minor fraction is important for Fe–S clusters synthesis, thus that there is a defined secondary site in ISCU [23]. This species most likely represents iron bound non-specifically to the protein. It must be noted that mouse ISCU is a difficult protein to handle as the disordered form that accumulates in the absence of metal forms higher order oligomers that do not bind iron. Thereby, the discrepancy with the XAS data may relate to protein preparations and buffer conditions if the other IscU/ISCU proteins behave similarly to mouse ISCU.

3.1.2. Iron Donor to IscU/ISCU

The fact that IscU/ISCU contains a zinc ion that hinders iron binding raises the question of the physiological mechanism of iron insertion. In vivo, the presence of the zinc might prevent accumulation of the disordered form. However, since zinc has a higher affinity than iron for IscU/ISCU [23,69], a still ill-defined metallochaperone might be required to exchange the metals. These data also raise the question of the physiological iron donor to IscU/ISCU.

Frataxin

The frataxin protein was initially proposed to function as an iron storage/donor for IscU/ISCU [82–87]. Although the iron-storage/chaperone function has been questioned by several studies [58], and the most recent data indicate that frataxin is an accelerator of persulfide transfer (see Section 3.5) [23,88,89], the iron chaperone hypothesis is still favored by a number of groups [90–96].

Eukaryotic cells that are defective or deleted for the gene encoding the frataxin protein display growth phenotypes associated with a deficit in Fe–S cluster biogenesis [97–101]. Indeed, the bacterial and eukaryotic frataxins interact with the core IscS–IscU and NFS1–ISCU complexes of the ISC machinery, indicating a direct role in Fe–S cluster biogenesis [86,102–105]. In humans, inherited mutations in the non-coding sequence of the frataxin locus lead to Friedreich's ataxia (FA), a neurodegenerative and cardiac disease [106]. This discovery has strongly fostered the research in the past years to elucidate the function of frataxin.

Based on the observations that (i) frataxin deficient cells accumulate iron in mitochondria and that (ii) bacterial CyaY and yeast Yfh1 frataxins bind ferric iron, which triggers auto-assembly into multimers, the hypothesis that frataxin functions as an iron storage has emerged [58,82,83,85,97,99,107,108]. However, the iron-storage function was challenged by several other studies. First, human frataxin (FXN) self-assembles into oligomers only under extreme conditions and in an iron-independent manner [109]. In yeast and mouse fibroblast, the self-assembly of frataxin is dispensable for its physiological function [110,111]. In yeast, overexpression of Yfh1 is unable to mitigate iron accumulation and binding of iron to Yfh1 could not be confirmed by immunoprecipitation [112,113]. In bacteria, the function of CyaY appears restricted to iron-rich conditions. Although this may be consistent with a role in iron storage, in yeast, there is no obvious effect of iron on the phenotype of cells lacking Yfh1 [59,97]. In mammals, a cardiac mouse model of FA showed that the accumulation of iron is not a primary defect but rather a consequence of the Fe–S cluster deficit [100]. Finally, the accumulation of iron is not a specific feature of frataxin deficiency since any defect in one of the core components of the ISC machinery also leads to dysregulated iron metabolism [114]. Altogether, these data have disqualified the iron-storage function for frataxin.

The frataxin protein was also proposed to function as an iron chaperone for IscU/ISCU, since monomeric frataxin from various organisms bind iron in vitro and several reconstitutions suggested that frataxin brings iron to the ISC machinery [86,87,92]. However, the number of iron-binding sites in frataxin varied from one study to another (from one to seven iron-binding sites), with both Fe²⁺ and Fe³⁺ binding with similar affinities, which rather suggest non-specific iron binding [82,87,108,115–118]. Indeed, FXN lacks a defined metal-binding site associated with well-conserved ligands such as cysteine, histidine and aspartate, but contains an acidic region that

binds several metals non-specifically via electrostatic interactions. This may provide a mean for frataxin to bring several labile iron ions nearby the assembly site of IscU/ISCU, but with low specificity, which is difficult to rationalize with a specific role in iron donation. Moreover, data from our group indicated that mammalian FXN is not required for iron insertion in ISCU [23]. Altogether, these data argue against a role of frataxin in iron donation; instead, a function as an accelerator of persulfide transfer is now proposed (see Section 3.5).

ISCA

A-type proteins (IscA, NiflscA and SufA) from various organisms were shown to bind ferric iron with high affinity and to provide iron to IscU/ISCU in Fe–S cluster reconstitution assays through a cysteine mediated process [119–125]. The Fe(III) center of bacterial IscA can be reduced by L-cysteine and released as free or cysteine bound Fe^{2+} ions, which provide a source of iron for IscU [119,125]. However, several *in vivo* studies argue against a role of the IscA/ISCA proteins in iron donation. First, deletion of the genes encoding the Isa1 and Isa2 proteins in yeast led to a slight increase in the iron content of Isu1, instead of lowering it as expected for an iron chaperone [32]. Several groups found that A-type proteins do not co-purify with iron alone but with a Fe–S cluster [126–129]. Indeed, *in vivo* and *in vitro* data rather point to a role of the A-type proteins as scaffolds for the synthesis of [4Fe4S] clusters or in the transfer of [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters [29,32,126,127,129,130]. Moreover, while no interaction with IscU/ISCU has been reported so far, the IscA/ISCA proteins interact with the late-acting components of the Fe–S cluster biogenesis pathway, which strengthen the idea that they are not involved at the early steps, i.e. iron insertion [29,131–133].

Connection with the Labile Iron Pool

If not frataxin or IscA/ISCA, then how does IscU/ISCU acquire iron? Only few iron metallochaperones have been identified in eukaryotes and prokaryotes [134–137]. Ferrochelatase is possibly the only attested iron chaperone in mitochondria [134]. Indeed, a general view of iron speciation in proteins is that non-heme iron proteins acquire their metal from a labile iron pool [135–137]. Due to the low structural diversity of metal-binding sites in proteins to discriminate one metal from another, insertion of the proper metal is controlled by its bioavailability and its intrinsic affinity, which follows the Irving–Williams series [135–137]. Thereby, metals with intrinsic high affinity are kept at very low concentration while weaker binders are present in the form of labile pools. Iron is among the weaker binders and the existence of labile iron pools is now corroborated by several studies. Recent investigations of cellular iron contents by Mössbauer spectroscopy suggest that it is composed of non-heme high-spin Fe(II) complex with primarily O and N donor ligands in concentrations estimated in the range of 1 to 10 μM , which is very close to the affinity of iron for most proteins [135–142]. Low-molecular-weight iron complexes with a mass-range of 500 to 1300 Da have been isolated from bacteria and mitochondria that may be central components of this labile iron pool [139–142]. Iron delivery to protein from these labile iron pools may involve small molecules, such as glutathione (GSH), instead of metallochaperones [137,143]. Finally, even though a chaperone is possibly dispensable for iron insertion, the most important step could be the release of the zinc ion from IscU/ISCU, which would require a chelatase.

3.2. Step 2: Sulfur Insertion

3.2.1. Two Different Classes of Cysteine Desulfurase

The second key step of Fe–S cluster synthesis is the insertion of sulfur. The cysteine desulfurases IscS and NFS1 are the source of sulfur for Fe–S cluster assembly in the ISC machinery. Cysteine desulfurases provide sulfur in the form of a persulfide bound to their catalytic cysteine (Cys-SSH) [39]. This persulfide is produced by desulfurization of L-cysteine catalyzed by their cofactor, a pyridoxal phosphate (PLP), which leads to formation of a persulfide on their catalytic cysteine. PLP-dependent enzymes form

a huge family that perform various types of elimination and substitution reactions on amino acids and their derivatives. Several structures of cysteine desulfurase have been solved and all revealed an arrangement as homodimers, in which the PLP-binding pocket of one subunit is completed by the second one (Figure 3A,B) [39,67,144–150]. Cysteine desulfurases also display key differences allowing their categorization in two classes owing to the length of the mobile loop carrying their catalytic cysteine [39]. This loop is much longer in class I than in class II enzymes, which facilitates long-range sulfur delivery to acceptors for class I enzymes. IscS and NFS1 as well as NifS belong to class I, while SufS, the cysteine desulfurase of the SUF machinery, belongs to class II.

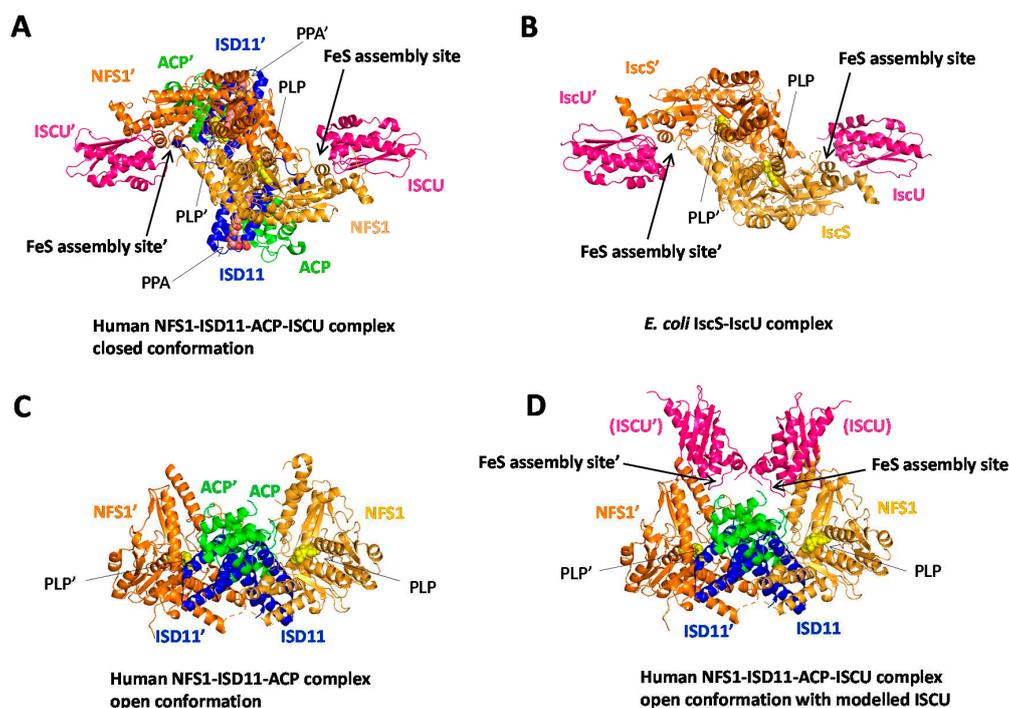


Figure 3. Structures of the human NFS1-ISCU and *E. coli* IscS-IsCU complexes. X-ray structures of (A) human NFS1-ISCU complex in the closed conformation (PDB code 5WLW) [67], (B) *E. coli* IscS-IsCU complex (PDB code 3LVL) [150], (C) human NFS1-ISCU complex in the open conformation (PDB code 5USR) [151] and (D) human NFS1-ISCU complex in the open conformation (PDB code 5USR) with the human ISCU proteins modeled according to the structure of the NFS1-ISCU complex (PDB code 5WLW). The labels for the ACP protein have been omitted for clarity in D. IscS/NFS1 are colored in orange, IscU/ISCU in pink, ISD11 in blue and ACP in green. The pyridoxal phosphate (PLP)-binding sites, the phosphopantetheine with its fatty acyl chain (PPA) and the Fe-S cluster assembly sites of IscU/ISCU are indicated by arrows.

Moreover, in eukaryotes, NFS1 forms a tight complex with the ISD11-ACP complex that regulates the activity of the ISC system in response to the level of acetyl-coA [60,67,151]. The crystal structure of the human NFS1-ISCU complex shows that binding of ISD11-ACP to NFS1 is mediated by ISD11 and that ACP is anchored to ISD11 via its fatty acid chain (Figure 3A) [67]. The ISD11-ACP complex stabilizes NFS1 since in its absence, NFS1 is poorly soluble [152,153]. The crystal structure of the complex indeed shows that ISD11 binds to a hydrophobic patch composed of Leu78 and Ile82 at the surface of NFS1, which most likely helps maintain NFS1 in a soluble form [67].

Strikingly, another crystal structure of the human NFS1-ISCU complex was solved which displays a completely different arrangement of the NFS1 and ISD11 proteins relative to each other while keeping the overall structure of the ISD11-ACP complex (Figure 3C) [67,151]. In this structure, the dimer interface is created by contacts between the hydrophobic patch of each NFS1 and via ISD11 that connects the two subunits of NFS1. The PLP-binding pocket is incomplete and thus the protein is

most likely catalytically inactive. This conformation is designated as open conformation [151] and the conformation in which the PLP-binding pocket is complete, is called the closed conformation [67]. It is still unclear whether the open conformation has a physiological relevance.

3.2.2. Mechanism Generating Persulfide in Class I Cysteine Desulfurase

While the mechanism of sulfur delivery clearly differentiates class I and II cysteine desulfurase, the mechanism of desulfurization is similar for both enzymes [39]. This mechanism relies on catalysis by the PLP cofactor which operates as an electron withdrawal group facilitating the elimination of sulfur on L-cysteine (Figure 4). The PLP cofactor is anchored to the enzyme via the side chain of a lysine through formation of an imine link, also called internal aldimine. The amino group of the L-cysteine substrate binds to the PLP by exchange with the amine of the lysine to form an external aldimine. This intermediate is converted into a ketimine in which a double bond is created between the enantiomeric α carbon of L-cysteine and its amino group. Then, the sulfur of L-cysteine is eliminated and “transferred” to the catalytic cysteine of the cysteine desulfurase, which leads to formation of a persulfide (-SSH) and creation of a double bond between the α and β carbon of the L-cysteine. Upon hydrolysis, alanine is released and a new cycle is initiated. Formally, a sulfanium cation (HS^+) is abstracted by the thiolate group of the catalytic cysteine. This formal description suggests that the reaction is an oxido-reduction process. The redox state of the terminal sulfur (also called sulfane sulfur) is commonly assumed to be “0” while the sulfur of the cysteine to which it is bound would stay at the -II redox state. However, this description is not correct since two identical atoms that are covalently attached have their redox state mutually affected and equals, as found in disulfides (RSSR') and hydroperoxides (ROOH) in which the sulfur and oxygen atoms are at the same -I redox state. Thereby, the formal redox states of the sulfurs in a persulfide are better described as -I for both of them, which indicates that the sulfur of L-cysteine is oxidized during the reaction and consequently the carbon carrying the sulfur of L-cysteine is reduced from -I to -III in L-alanine (Figure 4, red labels).

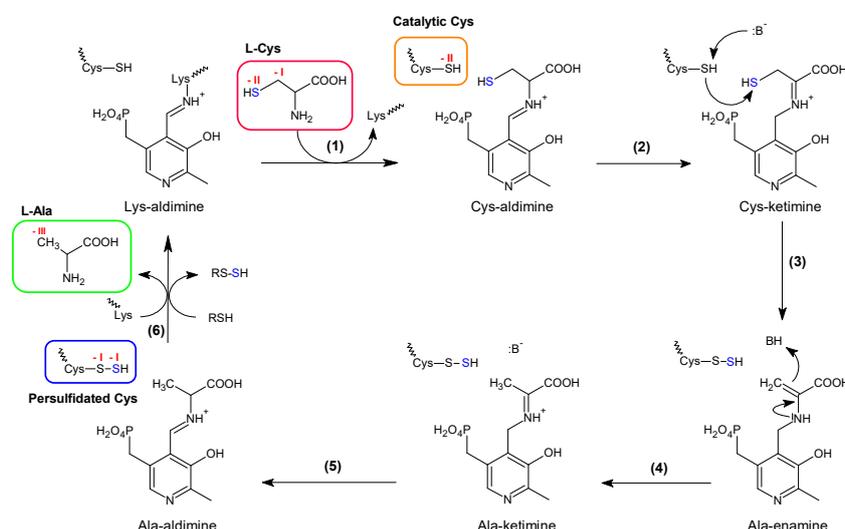


Figure 4. Mechanism of persulfide formation by cysteine desulfurases. The scheme presents the main intermediates in the catalytic cycle of cysteine desulfurases. The PLP cofactor is bound to the cysteine desulfurase backbone via the nitrogen of a lysine residue, in the form of a Lys-aldimine. The L-cysteine substrate exchanges with the lysine to form a Cys-aldimine (1), which is rearranged into a Cys-ketimine (2). A base ($:\text{B}^-$) deprotonates the thiol of the catalytic cysteine of the cysteine desulfurase and the resulting thiolate reacts with the thiol of the Cys-ketimine intermediate, which leads to formation of a persulfide on the catalytic cysteine (3). Concomitantly, a double bond is created with the carbon of the former L-cysteine substrate in the form of an Ala-enamine (3). Upon protonation, the Ala-enamine is converted into Ala-ketimine (4) and then Ala-aldimine (5). The sulfane sulfur (blue) of the persulfide is transferred to a thiol acceptor and L-alanine is released by exchange with the internal lysine residue (6).

The formal oxidation states of the relevant atoms of the reaction (sulfur and adjacent carbons) are indicated in red for the starting and final material. The reaction starts with two sulfurs at the -II oxidation state in L-cysteine and the catalytic cysteine with a carbon at -I in L-cysteine to end up with two sulfurs at the -I oxidation state in the persulfidated catalytic cysteine and a carbon at -III in L-alanine.

3.2.3. Sulfur Transfer to the IscU/ISCU Scaffold, a Metal-Driven Process

The first studies on the process of sulfur supply to IscU/ISCU were reported almost 20 years ago, with *A. Vinelandii* and *E. coli* IscS and IscU [154–156]. These studies showed that IscS transfers several persulfides to IscU. A sulfur-first model was then proposed, in which the persulfides are transferred and later on reduced upon binding of Fe^{2+} ions. Surprisingly, several persulfides (2 to 4) accumulated on IscU, which was difficult to rationalize with the requirement of only two sulfurs for the formation of a $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster [154,156]. Another study with *T. maritima* IscU mentioned that the persulfides transferred to IscU were not reducible by iron, unless iron was already bound to IscU prior to persulfide transfer [157]. Although the experimental data were not shown, an iron-first model was proposed, in which the iron binds first then a persulfide is transferred and reduced by iron. Thereby, controversies on the number of persulfide transferred to IscU/ISCU and the sequence of iron and sulfur insertions have emerged with two opposite models: sulfur-first and iron-first. It is now becoming clear that iron comes first and triggers the transfer of a persulfide (Figure 5) [23,89].

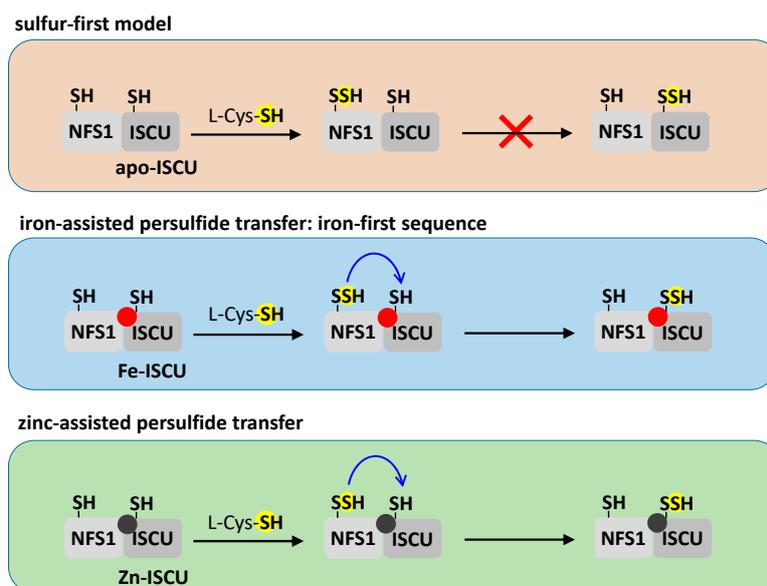


Figure 5. Metal-dependent persulfide transfer in the NFS1–ISCU complex. The sequence corresponding to the sulfur-first and iron-first models are depicted in the top two panels. First, a persulfide is formed on the catalytic cysteine of NFS1 (Cys381). Then, in the absence of a metal in ISCU (apo-ISCU), the persulfide of NFS1 is not transferred to ISCU (as shown by the red cross), which invalidates the sulfur-first model. In the presence of iron (red sphere, Fe–ISCU), the persulfide of NFS1 is transferred to the cysteine Cys104 of ISCU, which highlights the iron-first model. The third panel shows that, when zinc (dark gray sphere, Zn–ISCU) is present in the assembly site, instead of iron, it also triggers persulfide transfer. The blue arrows refer to movement of sulfur in trans-persulfuration reactions.

Persulfide transfer was also reported with the mouse and human NFS1–ISD11–ACP–ISCU complex [88,158]. Our analysis using mass spectrometry and an alkylation assay developed to directly visualize and quantify protein-bound persulfides, has established that a single persulfide is transferred to mouse ISCU [88]. The cysteine Cys104 was identified by mass spectrometry as the final persulfide receptor [88]. Furthermore, the transfer of persulfide to ISCU was correlated with Fe–S cluster assembly

thus indicating that it is a relevant step in this process (see next section) [23]. The accumulation of more than one persulfide was also observed with the mouse system but at longer time course and was not correlated with Fe–S cluster assembly, which may explain the transfer of multiple persulfides previously observed with *A. Vinelandii* and *E. coli* IscU proteins [23,88].

Interestingly, with the mouse system it was shown that in the absence of iron, the transfer of persulfide is abolished, which points to a metal-dependent process [23]. A similar iron-dependent persulfide transfer process was recently reported with the *E. coli* system [78]. Thus, the presence of iron is required to allow the transfer of persulfide, which experimentally confirms the iron-first model that was earlier proposed and discards the sulfur-first hypothesis (Figure 5). Surprisingly, persulfide transfer to ISCU is also enabled when zinc is in the assembly site, which is probably related to the identical coordination mode of iron and zinc in ISCU (Figure 5). This may indicate a physiological role for zinc as proposed for the zinc ion of SufU, a closely related homolog of IscU/ISCU (see Section 5.3.3) [159]. Moreover, the iron-like effect of zinc may explain the initial controversy in the models of iron and sulfur insertion sequences. Since zinc was likely present in the preparations of IscU, although its presence was not assessed [154–156], it has probably allowed persulfide transfer in the absence of iron and misled the authors to the conclusion that sulfur comes first.

Trans-persulfuration reactions are common to several sulfur insertion processes but none of them have been described as iron-dependent [39,40]. Indeed, this feature is likely specific to Fe–S cluster assembly systems as it coordinates sulfur supply with the presence of iron in ISCU. This raises the question of the mechanism of this new type of reaction. Since both, iron and zinc, enable persulfide transfer, the examination of the structures of the NFS1–ISCU complexes solved with zinc may help elucidate this mechanism. The X-ray structure of the human NFS1–ISD11–ACP–ISCU complex shows that the catalytic cysteine of NFS1 binds to the zinc center through exchange with Cys35 of ISCU (Figure 2B) [67]. Thus, the metal ion may play a structural role by positioning the catalytic cysteine of NFS1 at a short distance of the receptor cysteine (Cys104) of ISCU and additionally may play the role of a Lewis acid catalyst by providing an electrophilic character to the sulfane sulfur of the persulfide to promote the nucleophilic attack by the receptor cysteine on the persulfide. However, Cys104 is shielded by the metal ion and its surrounding ligands (Asp37, Cys61 and His103), which seems to preclude a direct transfer of persulfide to this residue. Persulfide transfer could thus be indirect via Cys35 or Cys61 as relays. However, a mutation of the cysteine Cys104 to serine does not lead to accumulation of a persulfide on Cys35 or Cys61 as expected if they were functioning as relays, which tends to invalidate this hypothesis [23,88]. Therefore, in keeping with the structural plasticity of ISCU discussed in the previous section, a structural rearrangement uncovering Cys104 to facilitate persulfide transfer seems more likely.

In conclusion, the detailed study of the persulfide transfer process provides the first compelling evidence of an iron-first mechanism in which persulfide transfer is triggered by the presence of iron in IscU/ISCU [23,78]. This represents the first encounter of sulfur with iron in the Fe–S cluster assembly process.

3.3. Step 3: Persulfide Reduction

3.3.1. Reduction by Iron

To generate the sulfide ions that are the constituents of Fe–S clusters, the persulfide must be reduced into sulfide. As discussed in the previous section, Fe²⁺ ions were initially proposed to be the reductant of the persulfide thereby yielding Fe³⁺ and sulfide ions, to generate an oxidized [2Fe2S]²⁺ cluster [154,155,157]. However, no reduction was observed with the mouse system after transfer of persulfide to ferrous iron-loaded ISCU [23]. Furthermore, the reduction of a persulfide by Fe²⁺ is chemically irrelevant since this reaction requires two electrons and Fe²⁺ provides only one electron by switching to the Fe³⁺ state.

3.3.2. Reduction by Thiols

Thiols, essentially dithiothreitol (DTT), but also GSH and cysteine were extensively used as reductants in Fe–S cluster reconstitution studies [61,78,158,160–164]. However, their mode of action was not thoroughly investigated until recently. Using the mouse ISC system, our group reported that thiols are able to release sulfide by direct reduction of the persulfide of NFS1, but are poorly efficient to reduce the persulfide transferred to ISCU, probably due to the presence of the metal that shields the receptor cysteine Cys104 [88]. The reduction of the persulfide of NFS1 by thiols occurs in reaction performed with excess of L-cysteine relative to the NFS1–ISCU complex (Figure 6A). Under these conditions, a persulfide is formed on NFS1 that is transferred to ISCU, then a new persulfide is formed on NFS1 that cannot be transferred to ISCU since it is already persulfidated, which leads to a complex persulfidated on both, NFS1 and ISCU. Since thiols react faster with NFS1 than with ISCU, this leads to preferential reduction of the persulfide sitting on NFS1. Thereby, the prominent source of sulfide ions in thiol-based reconstitution is NFS1 not ISCU. This reduction proceeds in two steps: (1) trans-persulfuration of the thiol leading to a persulfidated thiol (RSSH) and (2) cleavage of the S–S bond of the persulfidated thiol by another thiol molecule (Figure 6A). The sulfide ion then combined with iron to form a Fe–S cluster. The thiol-based reactions indiscriminately lead to formation of both [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters with variable proportions [61,162,164–167]. DTT further enhances the proportion of [4Fe4S] cluster versus [2Fe2S] and also generates high-molecular-weight (HMW) Fe–S minerals [167]. This was attributed to the ability of DTT to stimulate the rate of sulfide release more strongly than L-cysteine, thereby creating a bulk of sulfide that reacts with [2Fe2S] clusters to generate [4Fe4S] clusters and eventually forms HMW Fe–S minerals. Surprisingly, the thiol-based reconstitution is also operative when zinc is present in the assembly site of ISCU, but is much slower probably due to hindrance of Fe–S cluster formation by the zinc ion [23].

Such thiol-based Fe–S cluster assembly reactions rely on “free” sulfide ions and their production is not coupled with the presence of iron. This type of reaction is probably inefficient in vivo for Fe–S cluster assembly as the sulfide ions will diffuse outside of the ISC complex and the probability of iron and sulfur encounter will be very low. Therefore, thiol-based reactions are not considered as physiologically relevant for Fe–S cluster assembly.

3.3.3. Ferredoxin and Iron Mediated Reduction of Persulfides

The [2Fe2S] ferredoxin Fdx/FDX2 was also proposed to function as a reductant of persulfides. The deletion of the gene encoding Fdx in *E. coli* and the depletion of Yah1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, both led to impaired Fe–S cluster biosynthesis [168–171]. Moreover, *yah1* is an essential gene in yeast, which points to a critical role of ferredoxins [169]. In human, two ferredoxins are present in mitochondria, the adrenodoxin (FDX1), and a closely related homolog named FDX2 (or FDX1-like) [172]. FDX1 is mainly expressed in adrenal glands where it is involved in steroid biosynthesis, while FDX2 is ubiquitously expressed and is essential for Fe–S cluster biogenesis in mitochondria [172]. Another study reported that both FDX1 and FDX2 function in Fe–S cluster biosynthesis [173]. However, the tissue specificity of FDX1 to adrenal glands most likely dictates its role. Cognate reductase partners were identified in *E. coli* (the ferredoxin–NADP reductase FerR), human (FdxR) and yeast (adrenodoxin reductase Arh1) that provides electrons from NAD(P)H to Fdx/FDX2 (Table 1) [169,173–175].

Fe–S cluster reconstitution assays showed that *E. coli*, yeast and mouse ferredoxin/ferredoxin reductase systems are able to replace DTT [23,24,176]. NMR studies with mouse and bacterial proteins reported that Fdx binds IscS [177–179]. It was thus proposed that Fdx reduces the persulfide of IscS into sulfide. However, this mechanism is reminiscent of the thiol-based reconstitution in which sulfide is released irrespective of the presence of iron. Moreover, IscU was reported to displace Fdx, thereby preventing synchronization of sulfide production with the presence of IscU to uptake these sulfide ions [178]. In contrast, NMR and SAXS studies of the eukaryotic *Chaetomium thermophilum* ISC complex showed that FDX interacts with both NFS1 and ISCU [24,67]. The first experiments

directly testing the effect of ferredoxin on the persulfide of NFS1 and ISCU were carried out with the mouse system by tracking the persulfide during the reaction, using mass spectrometry and alkylation assays [23]. The step-by-step analysis revealed that FDX2 selectively reduces the persulfide transferred to Fe-ISCU but does not reduce the persulfide of NFS1 (Figure 6B). Importantly, this reduction step leads to formation of a [2Fe2S] cluster in ISCU, thus indicating that it is a critical step of the assembly process. Titrations have further indicated that this reaction is highly efficient with about 90% of L-cysteine converted into a [2Fe2S] cluster whereas thiol-based reactions are poorly efficient with only 5% of L-cysteine actually incorporated as sulfide ions in the Fe-S cluster. Moreover, the FDX2-based reaction is about 100 times faster than the thiol-based one.

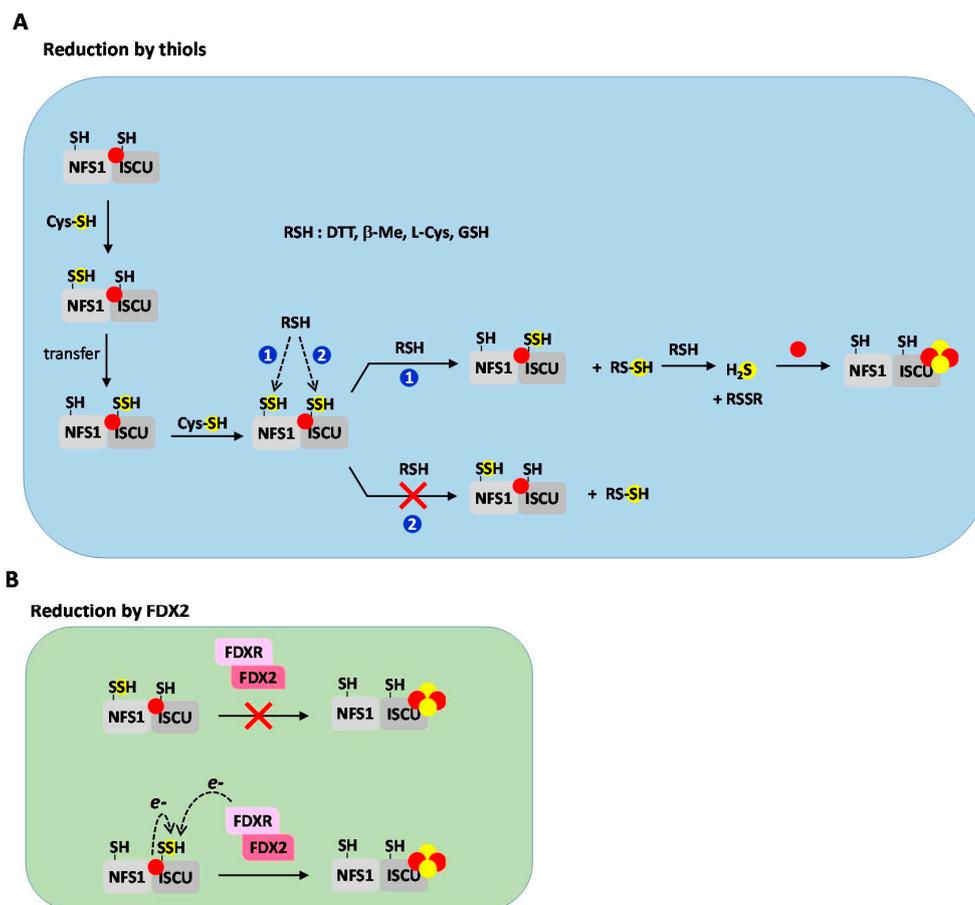


Figure 6. Selective reduction of the persulfide of NFS1 and ISCU by thiols and FDX2. (A) Thiols (RSH) such as dithiothreitol (DTT), L-cysteine, β -mercaptoethanol and GSH react with the persulfide of NFS1. Once a persulfide is formed it is transferred to ISCU, then a second persulfide is formed on NFS1. Thiols reduce the persulfide of NFS1 (reaction 1), which generates free persulfidated thiol (RSSH) that reacts with a second molecule of thiol to liberate sulfide ions in solution. Sulfide exists as H_2S , HS^- and S^{2-} depending on the pH, with HS^- the predominant form at physiological pH (pH \approx 8 in mitochondria). The sulfide ions react with iron to generate [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters in ISCU. In contrast, the persulfide of ISCU is poorly reactive with thiols (reaction 2, the red cross indicates that the reaction does not occur), most likely due to the presence of the metal ion that shields Cys104. Thereby, sulfide ions originate mainly from reduction of NFS1. The dashed black arrows describe the reaction of the thiols on the persulfide of either NFS1 or ISCU (B) FDX2 does not reduce the persulfide of NFS1 (top, the red cross indicates that the reaction does not occur), but selectively reduces the persulfide of ISCU when iron is present in the assembly site (bottom). A mechanism is proposed in which FDX2 provides one electron and the ferrous iron of ISCU the second one to reduce the S-S bond of the persulfide. The dashed black arrows show the origins of these two electrons.

Interestingly, the reduction of the persulfide of ISCU by FDX2 is abolished in the absence of metal and when zinc is present instead of iron in ISCU, which points to a specific role of iron in the reduction process. A mechanistic rationale could be that the iron ion participates as a redox partner. The iron ion is initially ferrous and ends-up as ferric in the $[2\text{Fe}_2\text{S}]^{2+}$ cluster, thereby it might provide one of the two electrons needed to reduce the persulfide, the other one would be delivered by FDX2 (Figure 6B). Altogether, these data support the hypothesis that the reduction of the persulfide of ISCU is specifically coordinated with the presence of iron, which would ensure that the nascent sulfide is instantly trapped by the iron ion. In the SAXS-based model of the *C. thermophilum* ISC complex, the $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster of FDX is located nearby the assembly site of ISCU, thus in a suitable position to transfer electrons to the metal center for persulfide reduction [67]. Finally, the titrations of the number of persulfide reduced by FDX2 indicated that only one sulfide is produced per iron-loaded monomer of ISCU [23]. Hence, the most reasonable hypothesis is that the product of the reaction is a mononuclear iron–sulfide ($[1\text{Fe}_1\text{S}]$) species. A number of non-heme mononuclear iron–sulfide inorganic complexes have been reported, thus providing credence to the formation of the same type of species in IscU/ISCU; however, a clear demonstration is still awaited [180–184].

In conclusion, the FDX2-driven reduction of the persulfide on iron-loaded ISCU appears as a concerted process that coordinates sulfide production with presence of iron, which concomitantly prevents escape of the sulfide ions. For these reasons, it has been proposed that the FDX2-based mechanism describes the physiological process of Fe–S cluster assembly [23]. This represents the second encounter of iron and sulfur in the Fe–S cluster assembly process. It is likely that a similar concerted mechanism occurs in the bacterial system, but it has not been demonstrated as of yet. Finally, these data highlight that thiols cannot be considered as surrogates of FDX2 in Fe–S cluster reconstitution assays, as they reduce the persulfide of NFS1, whereas FDX2 reduces the persulfide of ISCU; thus, the mechanisms of sulfide production are completely different. Furthermore, persulfide reduction by thiols is not coupled with the presence of iron.

3.4. Step 4: Fe–S Cluster Formation

The last step, after reduction of the persulfide, is the formation of the $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster. This requires formation of a dinuclear iron center with a di- μ -sulfido bridge. Since the titration of persulfides with the mouse system point to the formation of a mononuclear $[1\text{Fe}_1\text{S}]$ iron–sulfide complex, dimerization of IscU/ISCU is likely an obligatory step to form the dinuclear $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster (Figure 7). The dimerization would generate a bridged $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster, as observed with glutaredoxins that are involved in Fe–S cluster transfer [185–188]. In the reconstitutions performed with *C. thermophilum* Isu1, the final product was a $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster in a dimer of Isu1. However, this stoichiometry is also consistent with an asymmetric configuration in which only half of the subunits are occupied [24]. In contrast, a monomer of ISCU carrying one $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster has been identified by native mass spectrometry and Mössbauer spectroscopy as the final product in reconstitution assays performed with the mouse ISC system [23]. Therefore, if a bridged $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster is formed, it is a transient species that rapidly relocates on one of the subunits (Figure 7) [23]. Then, the dimer dissociates to release the monomer of ISCU holding a $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster.

An appealing hypothesis is that the dimeric structure of cysteine desulfurases assists the dimerization of IscU/ISCU within the complex. In the closed conformation of the human NFS1–ISD11–ACP–ISCU complex, the ISCU proteins are very distant (Figure 3A) [67,150], but in its open conformation, the predicted binding sites for ISCU are adjacent and the ISCU proteins are arranged along a C2 axis (Figure 3D) [151], thus in suitable positions for dimerization and formation of a dinuclear center. However, further tightening of the NFS1 subunits would be required to allow contact of the ISCU proteins, so it is not clear whether a dimer could actually form. In contrast, formation of dimers of holo-IscU/ISCU have been reported in several thiol-based reconstitutions [62,81,189,190]. Even a trimeric state has been crystallized with *Aquifex aeolicus* IscU, in which only one subunit harbors a $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ cluster [64]. Fe–S reconstituted IscU proteins from *T. maritima* and *A. vinelandii* were shown to

bind one [2Fe2S] cluster per dimer that could correspond to a bridged [2Fe2S] cluster [61,62]. However, the analysis by Mössbauer, electronic absorption and Raman spectroscopies led to the conclusion that the [2Fe2S] cluster in both species is coordinated in an asymmetric environment by the three cysteines Cys35, Cys61, Cys104 and most likely the aspartate Asp37. Since a bridged [2Fe2S] cluster is expected to be symmetric, this asymmetric arrangement indicates that the [2Fe2S] cluster is not bridged but hosted in one of the two subunits of the dimer. A similar signature was observed for the [2Fe2S] cluster in mouse ISCU, which is a key feature indicating that the [2Fe2S] is ligated by a monomer of ISCU [23].

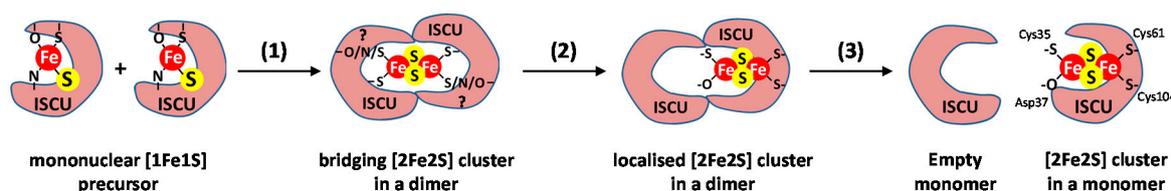


Figure 7. Hypothetic model for the formation of the [2Fe2S] cluster by dimerization of IscU/ISCU. The model for the formation of a [2Fe2S] cluster in IscU/ISCU is decomposed in three steps: (1) the dimerization of two ISCUs coordinating a mononuclear [1Fe1S] intermediate generates a bridged [2Fe2S] cluster in a dimer of ISCU, (2) the [2Fe2S] segregates on one monomer and (3) the dimer dissociates to yield an empty monomer and a monomer containing the [2Fe2S] cluster. In the monomer, the [2Fe2S] cluster is coordinated by Cys35, Asp37, Cys61 and Cys104 of ISCU.

Interestingly, the kinetic analysis of the thiol-based Fe–S cluster assembly process with *A. Vinelandii* IscU showed that the dimer loaded with one [2Fe2S] cluster is a precursor of the dimer loaded with two [2Fe2S] clusters [61]. Therefore, the second [2Fe2S] cluster seems to be assembled by gathering of two iron and two sulfide ions in the empty subunit of the dimer loaded with one [2Fe2S] cluster, thus without requirement for a bridged [2Fe2S] cluster. A similar mechanism was recently proposed for GSH-based Fe–S cluster assembly with *E. coli* IscU [78]. It thus seems that the non-physiological DTT-based route proceeds via sequential accumulation of iron and sulfide ions on a single subunit of dimeric IscU/ISCU while the physiological FDX2-based route involves formation of a still ill-defined transient bridged [2Fe2S] cluster.

In conclusion, although a bridged [2Fe2S] cluster has not been isolated, the ability of IscU/ISCU to dimerize provides credence to a mechanism based on merging of two mononuclear [1Fe1S] precursors. The conformational flexibility of the NFS1–ISD11–ACP complex further raises the possibility that NFS1 could promote dimerization of ISCU, but it is unclear whether bacterial IscS are also capable of such a structural change.

3.5. Regulation of Fe–S Cluster Assembly by Frataxin

3.5.1. Effect of Frataxin on Cysteine Desulfurase Activity: The Key Question of the Rate-Limiting Step

The Pastore group reported that the bacterial frataxin homolog, CyaY, modulates the activity of IscS in the IscS–IscU complex [160]. CyaY decreases the rate of L-alanine production, the by-product of the desulfurization process and this was correlated with a concomitant decrease in the rate of Fe–S cluster production by the IscS–IscU complex in a DTT-based reconstitution. Moreover, the inhibitory effect of CyaY was more pronounced in the presence of iron. Thereby, a function as a gate-keeper preventing uncontrolled production of sulfide ions in the absence of iron, was proposed. In contrast, in DTT-based reconstitutions with the human and mouse ISC system, the eukaryotic frataxin protein (FXN) stimulates the cysteine desulfurase activity of NFS1 [88,164,191]. Moreover, it was shown that the stimulatory effect of FXN is only seen in the presence of ISCU [88,164,191]. These data thus indicate that frataxin affects the activity of cysteine desulfurases in the IscS/NFS1–IscU/ISCU complex, but in different ways depending on the organism.

Several groups have thus studied the cysteine desulfurase activity in more details to determine the kinetic parameters of this reaction [88,158,162–164,191–194]. Most of these assays were conducted in multiple turnover kinetics by monitoring the rates of sulfide or L-alanine productions in the presence of DTT to reduce the persulfide of NFS1 (Figure 8A) [88,158,162–164,191–194]. In multiple turnover kinetics, the rate-limiting step (i.e., the slowest step) dictates the global rate of the reaction. As the cysteine desulfurase assay encompasses two main reactions: persulfide formation (Figure 8A, reaction 1) and persulfide reduction (Figure 8A, reaction 2), either of these reactions could be rate-limiting. In some studies, saturation behaviors were apparently observed upon increase of L-cysteine, which was interpreted as formation of a complex between L-cysteine and NFS1 for persulfide formation (Figure 8A, reaction 1) [158,162–164,191–193]. Since L-cysteine was thought to be involved only at the first step, it was assumed that persulfide formation is the rate-limiting step. Thereby, the effects of FXN and CyaY were interpreted as a modulation of the rate of persulfide formation. The Michaelis–Menten formalism was applied and K_M and k_{cat} values were reported.

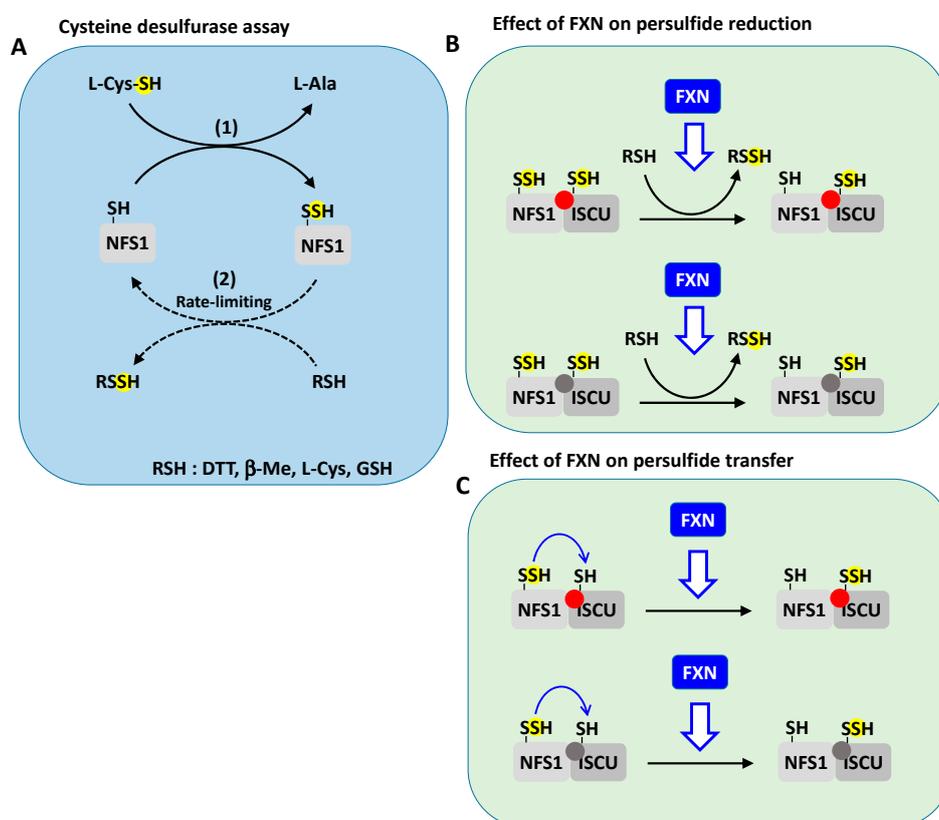


Figure 8. Effect of FXN on persulfide reduction and transfer. (A) The cysteine desulfurase assay encompasses two reactions: (1) formation of the persulfide and (2) its reduction by thiols (RSH). Reduction by thiols is the slowest step (rate-limiting step, dashed black arrows). (B) FXN accelerates the reduction of the persulfide of NFS1 by thiols in the NFS1–ISCU complex with ISCU metallated by iron (red ball) or zinc (gray ball). (C) FXN accelerates the transfer of the persulfide of NFS1 to ISCU in the NFS1–ISCU complex with ISCU metallated by iron (red ball) or zinc (gray ball). The solid blue arrow describes the transfer of persulfide. The blue arrows filled in white refer to acceleration by FXN.

However, a clear demonstration that persulfide formation is rate-limiting in those assays was not provided. Two kinetic studies have addressed the question of the rate-limiting step, with mouse NFS1 and *Synechocystis* IscS [88,195]. In both cases, the rate of L-alanine production was found proportional to the concentration of DTT and additionally to TCEP and β-mercaptoethanol in the case of *Synechocystis* IscS. Since DTT, TCEP and β-mercaptoethanol are not involved in the formation of the persulfide but in its reduction, this indicates that the reduction is the rate-limiting step. Second, it was shown that

L-cysteine is also able to reduce the persulfide of NFS1, thus that the saturation behaviors previously observed could also be interpreted as formation of a complex between L-cysteine and persulfidated NFS1 at the second step (Figure 8A, reaction 2) [88].

A definitive proof that reduction is the rate-limiting step was provided by monitoring persulfide formation and reduction independently in single turnover kinetics with the mouse NFS1–ISD11–ACP complex, using an alkylation assay to quantify protein bound persulfides [88]. Our group showed that persulfide formation is much faster than its reduction by DTT, hence that persulfide reduction, not its formation, is rate-limiting. Moreover, FXN was shown to directly accelerate persulfide reduction by DTT and to the same order of magnitude as its stimulatory effect on the global cysteine desulfurase activity, which further strengthens that persulfide reduction is the rate-limiting step (Figure 8B). Consequently, the ability of FXN to modulate the cysteine desulfurase activity of NFS1 indicates that it facilitates the reduction of the persulfide of NFS1 by thiols (Figure 8A reaction 2, Figure 8B). Even though other studies reported that FXN modulates the rate of persulfide formation, as this reaction is not rate-limiting, this effect of FXN is not expected to impact the cysteine desulfurase activity of NFS1 [89,194].

Moreover, no saturation behavior was observed with mouse NFS1 at low L-cysteine concentrations that could be consistent with the K_M and k_{cat} values reported in other studies [88]. Saturation curves were observed but at high, non-physiological, L-cysteine concentrations (above 50 mM). This was attributed to inhibitory effects by L-cysteine and/or DTT in other systems [43,195]. Anomalous behaviors were also reported for IscS and NifS from *E. coli* and *A. vinelandii*, which precluded determination of the kinetic parameters using the Michaelis–Menten formalism [41,43,196,197]. Altogether, this indicates that persulfide reduction does not proceed through formation of an enzyme-substrate complex but is a bimolecular reaction and that determination of K_M and k_{cat} for L-cysteine is not applicable [88].

Similar extensive studies have not been carried out yet with the *E. coli* system. However, the analysis of *Synechocystis* IscS affords evidence that persulfide reduction is also rate-limiting with a bacterial protein, which suggests that this could be a common feature of class I cysteine desulfurases. This would indicate that CyaY and FXN have opposite effects. However, this differential effect is rather due to the nature of the cysteine desulfurase, since exchanging IscS for the NFS1–ISD11–ACP complex turns CyaY into an activator [163]. Altogether, these data indicate that FXN, and probably CyaY too, modulates the rate of persulfide reduction by DTT and other thiols. However, as discussed in the previous sections, the thiol-based reaction is not physiologically relevant, which means that the effects of FXN and CyaY on the reduction of the persulfide of NFS1 by thiols are unrelated to Fe–S cluster biosynthesis in vivo.

3.5.2. Effect of Frataxin on Persulfide Transfer

Strikingly, assays of persulfide transfer and ^{35}S labeling experiments showed that mouse and human FXN have a strong impact on persulfide transfer to ISCU (Figure 8C) [23,88,158]. Mouse FXN was shown to enhance the rate of this reaction with both Zn–ISCU and Fe–ISCU (Figure 8C) [23,88]. The acceleration with Fe–ISCU was directly correlated to its stimulatory effect on Fe–S cluster assembly in FDX2-based reconstitution assays since persulfide transfer was identified as the rate-limiting step of the whole process [23]. Therefore, the sole function of mammalian FXN that appears relevant to the stimulation of the FDX2-based Fe–S cluster biosynthesis is the stimulation of persulfide transfer.

These data raise the question of the mechanism by which FXN stimulates persulfide transfer. Interestingly, the acceleration of persulfide transfer by FXN is metal-dependent as is persulfide transfer itself, with zinc and iron equally efficient [23]. This strengthens the idea that FXN accelerates the reaction, but does not modify its overall mechanism. The structure of the pentameric NFS1–ISD11–ACP–ISCU–FXN complex with zinc in the assembly site shows that FXN induces a rearrangement of the coordination sphere of the zinc ion (Figure 2C) [73]. The asparagine N141 and the Trp155–Arg165 pair of FXN tears out Cys35 and His103 from the metal ion through specific interactions. The movements induced by FXN thus seems to open the access to Cys104 by pushing aside Cys35 and

His103. Moreover, Cys104 comes closer to the metal ion as His103 is pulled out. Altogether, this may facilitate direct persulfide transfer to Cys104. However, FXN also interacts with the flexible loop of NFS1 and stabilizes the catalytic Cys381 halfway between the PLP and ISCU, which is difficult to rationalize with the stimulation of persulfide transfer and even persulfide formation on NFS1 [73]. However, this position should correspond to an intermediate state since the flexible loop needs to move back to the PLP pocket for persulfide loading.

Another important feature of the stimulation provided by FXN is that it does not modify the nature of the Fe–S cluster formed, i.e., a [2Fe2S] cluster [23]. This behavior fits the notion of a kinetic activator or an co-enzyme rather than an allosteric modulator as earlier proposed [162]. The term “allos” indeed comes from the ancient Greek “ἄλλος”, meaning “other”, and, thus, “allostery” applies to regulators that do not bind to the active site of the enzyme but at another site to modulate its activity, while FXN actually binds to the active site of the ISCU protein.

3.6. Toward a Model of [2Fe2S] Cluster Biosynthesis by the ISC Machinery

Altogether, the current data provide a more complete picture of the mechanism of Fe–S cluster assembly by the ISC machinery. Figures 9–11 depict the models based on these data. Since most mechanistic information originates from the eukaryotic systems, essentially the mouse and human ones, the mammalian nomenclature is used here to describe the mechanisms. Nonetheless, several features of the bacterial machineries suggest that the mechanism of Fe–S cluster assembly is conserved across species. A first striking conclusion is that Fe–S clusters can be assembled via two different routes: the FDX2-based reaction that is physiologically relevant (Figures 9 and 10) and the thiol-based one that is also productive of Fe–S clusters, but only in vitro and is thus not considered as physiologically relevant (Figure 11) [23]. The second breakthrough is the elucidation of the first steps of the FDX2-based reaction leading to production of the sulfide ions and its encounter with iron. The next steps are more elusive. The formation of a dinuclear [2Fe2S] cluster is supposed to rely on dimerization of ISCU and two mechanisms are postulated: either ISCU dimerizes within the complex with assistance from NFS1 (Figure 9) or the NFS1–ISCU complex dissociates and ISCU auto-dimerizes (Figure 10).

The first steps of the FDX2-based reaction are common to both hypothesis (Figures 9 and 10). The reaction is initiated by insertion of a ferrous iron in the assembly site of ISCU, which may require a still ill-defined metallochaperone to remove the zinc ion. It is unclear whether zinc removal and iron insertion in ISCU occur in the NFS1–ISCU complex or in free ISCU, or both. The iron site of ISCU is mononuclear and iron is stable as a high spin Fe(II) center. Upon formation of a complex with the cysteine desulfurase NFS1, a persulfide is transferred to the Cys104 of ISCU, in an iron dependent manner. This iron-assisted reaction allows synchronization of sulfur supply with the presence of iron. This mechanism is referred to the iron-first model since iron comes first then sulfur. Then, FDX2 reduces the persulfide bound to ISCU. The reduction is also iron-dependent, which probably ensures that the production of the sulfide ion is coordinated with the presence of iron, thereby allowing the iron center to trap the nascent sulfide ion.

The reduction by FDX2 would lead to a mononuclear [1Fe1S] species and the dimerization of ISCU would enable formation of a bridged dinuclear [2Fe2S] cluster, either within the NFS1–ISCU complex (Figure 9, internal dimerization) or as a free protein upon dissociation of the NFS1–ISCU complex (Figure 10, external dimerization). In both cases, the transient inter-subunit [2Fe2S] cluster would quickly segregate on one monomer and the chaperone/co-chaperone system HSPA9/HSC20 would enable the transfer of the [2Fe2S] cluster to client proteins. A last important feature of the FDX2-based process is that the rate of Fe–S cluster biosynthesis is controlled by frataxin that accelerates persulfide transfer, the rate-limiting step of the whole process.

Physiological process of Fe-S cluster biosynthesis, NFS1-assisted dimerization of ISCU

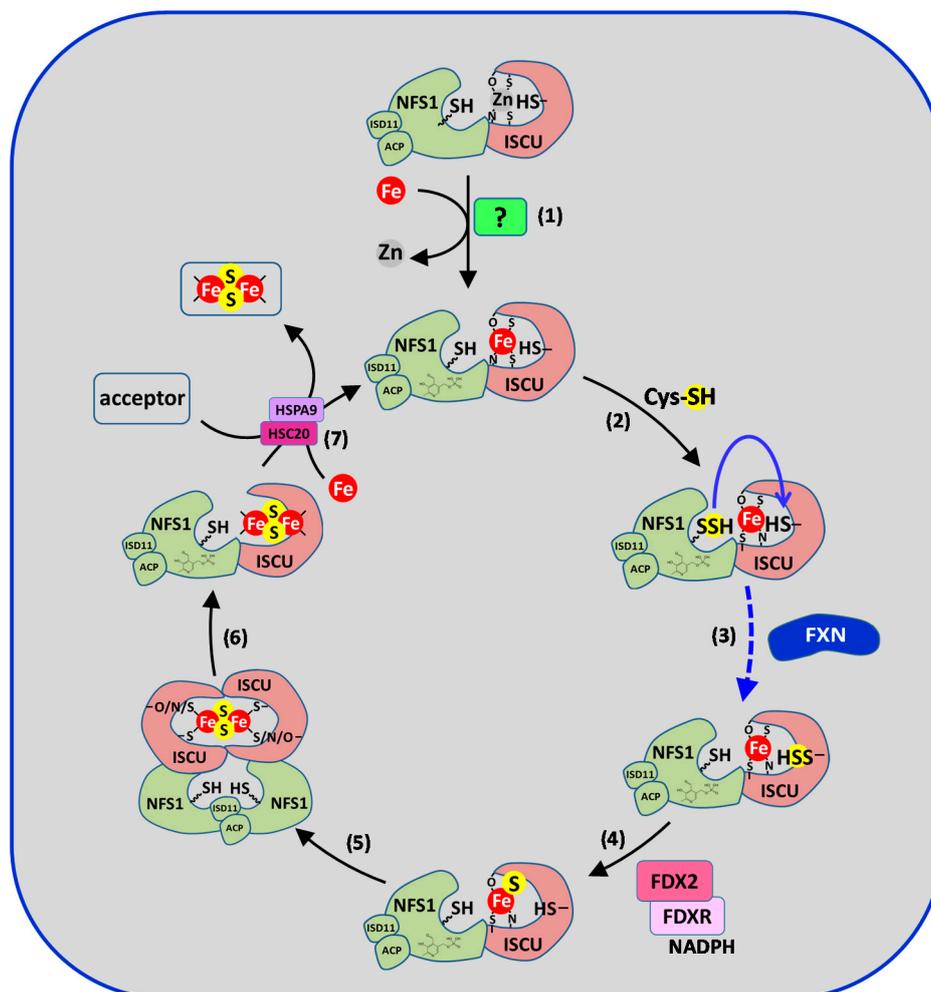


Figure 9. Model of FDX2-based Fe-S cluster biosynthesis by the eukaryotic ISC machinery relying on NFS1-assisted dimerization of ISCU. The reaction is initiated by insertion of iron in apo-ISCU, which may require a still ill-defined metallochaperone to remove the zinc ion (1). In the complex formed with NFS1-ISCU, a persulfide is formed on NFS1 (2) and transferred to ISCU (3). The persulfide of ISCU is reduced by FDX2, possibly into a mononuclear iron-sulfide intermediate (4). Then NFS1 in its open conformation enables the dimerization of ISCU, which leads to formation of a bridged [2Fe₂S] cluster in ISCU (5). The bridged [2Fe₂S] cluster segregates on one subunit (6) and is transferred to client proteins by the HSC20/HSPA9 chaperone system while a ferrous iron is inserted into apo-ISCU (7). FXN stimulates the whole reaction by accelerating persulfide transfer to ISCU (3). The solid blue arrow describes sulfur transfer to ISCU and the dashed blue arrow refers to the rate-limiting step that is accelerated by FXN.

Physiological process of Fe-S cluster biosynthesis, dimerization of free ISCU

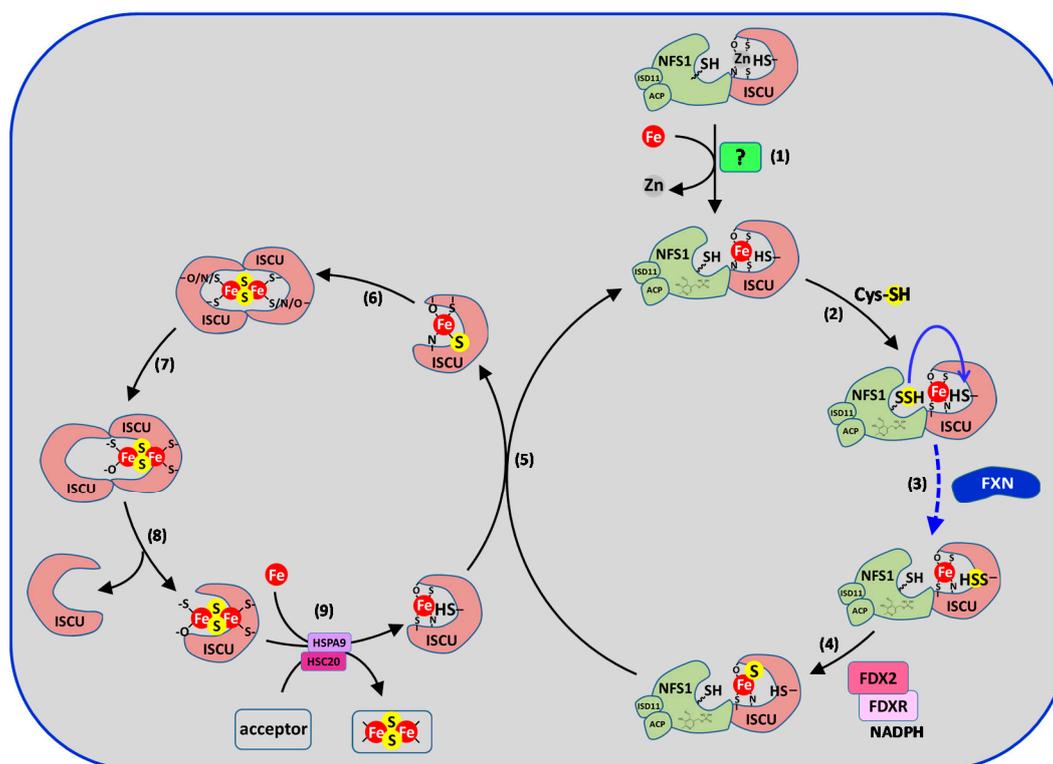


Figure 10. Model of FDX2-based Fe-S cluster biosynthesis by the eukaryotic ISC machinery relying on dimerization of free ISCU. Steps (1)–(4) are common to the mechanism described in Figure 9 until formation of the putative mononuclear iron–sulfide intermediate ([Fe–S]). Then [1Fe1S]-loaded ISCU dissociates from NFS1 either by exchange with Fe-loaded ISCU or spontaneously (5), which allows dimerization of ISCU and formation of a bridged [2Fe2S] cluster (6). The bridged [2Fe2S] cluster segregates on one subunit (7) and the dimer dissociates (8). The monomer of [2Fe2S]-loaded ISCU is recognized by the HSC20/HSPA9 chaperone system which enables the transfer of the [2Fe2S] cluster to client proteins while a ferrous iron is inserted into apo-ISCU (9). FXN stimulates the whole reaction by accelerating persulfide transfer to ISCU (3). The solid blue arrow describes sulfur transfer to ISCU and the dashed blue arrow refers to the rate-limiting step that is accelerated by FXN.

A distinct reaction occurs when thiols are used instead of Fdx/FDX2 as a reducing agent (Figure 11). Thiols such as DTT, GSH and L-cysteine reduce the persulfide of IscS/NFS1, which leads to release of sulfide ions in solution. The sulfide ions then combine with iron, either in solution or in the assembly site, to form [2Fe2S] and [4Fe4S] clusters. This process is not considered as physiologically relevant since production of sulfide is not confined to IscU/ISCU and is not synchronized with the presence of iron. In a biological context, the sulfide ions will diffuse outside of the ISC complex and the likelihood of iron and sulfur encounter will be very low.

However, the thiol-based reduction may compete with sulfur delivery to IscS/ISCU and thus could impede Fe–S cluster assembly. Moreover, in eukaryotes, FXN accelerates this reaction. Since the rate of the thiol-based reduction is proportional to the concentration of the thiol, the turning point at which this reaction starts to compete with Fe–S cluster assembly relies on its concentration. The relevant thiols that should be considered are the most abundant ones in the cells, i.e., GSH (5–10 mM) and L-cysteine (≈ 0.1 mM) [198–200]. Based on the kinetic constants determined for mouse NFS1 with GSH and L-cysteine, the thiol-based reduction would compete with transfer at concentrations of GSH and L-cysteine of 1 M and 15 mM, respectively, thus far from their physiological concentrations [88]. It is thus unlikely that persulfide reduction could compete with persulfide transfer *in vivo*.

Non-physiological process of Fe-S cluster synthesis, thiol-based reaction

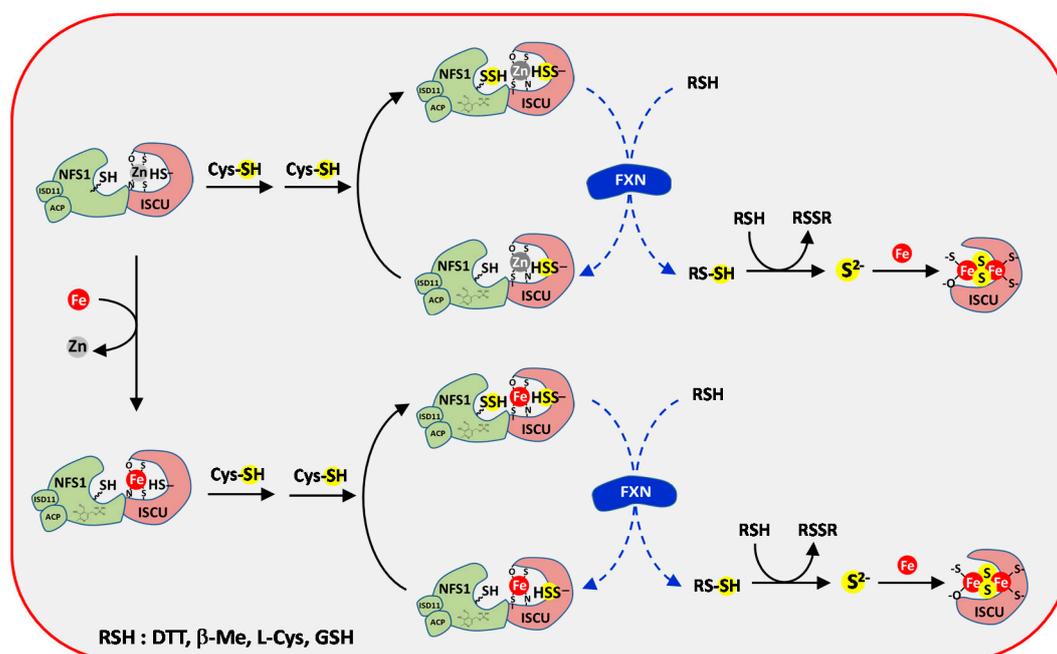


Figure 11. Thiol-based Fe-S cluster synthesis by the eukaryotic ISC machinery. The thiol-based reaction is described for the zinc- and iron-loaded ISCU. In both cases, the reaction is initiated by formation of an NFS1-ISCU complex persulfidated on both NFS1 and ISCU, then thiols, (RSH) such as L-cysteine, DTT, GSH or β-mercaptoethanol, reduce the persulfide of NFS1, which leads to sulfide release. In the presence of iron, the sulfide ions generate Fe-S clusters in ISCU via a poorly defined mechanism. The dashed blue arrows refer to the rate-limiting steps that are accelerated by FXN.

4. Fe-S Assembly by the NIF Machinery

4.1. Iron Insertion in NifU

The NIF machinery comprises two main proteins, the scaffold protein NifU and the cysteine desulfurase NifS. NifU is a modular protein containing three distinct domains [36,41,201]. An N-terminal domain with very high homology to IscU/ISCU, a central domain harboring a permanent [2Fe2S] cluster homolog to ferredoxin and a C-terminal domain called NfU that has been proposed to function as a scaffold of [4Fe4S] clusters and a Fe-S cluster carrier.

The N-terminal domain contains all the well-conserved amino acids that bind the ferrous iron in IscU/ISCU: Cys35, Asp37, Cys61 and His103. It also contains the persulfide receptor Cys104 [23]. The N-terminal domain of NifU was shown to bind a mononuclear iron ion, most likely via Cys35, Cys61 and Cys104. However, in contrast to IscU/ISCU iron binds in the ferric state and Asp37 is not involved in its coordination [201]. Moreover, binding of Fe³⁺ to NifU is only observed below 2 °C, which questions its role in Fe-S cluster biosynthesis. In another study, time-course analysis by Mössbauer spectroscopy suggested that ferrous iron binds to NifU in a cysteine-rich site, which may correspond to the assembly site of the N-terminal IscU/ISCU domain [38]. Thereby an iron-first mechanism may also apply to NifU as reported for IscU/ISCU.

4.2. Still Elusive Steps Leading to Formation of the [2Fe2S] and [4Fe4S] Clusters

It is still unclear how NifU acquires sulfur. Although NifU and NifS form a complex, persulfide transfer to NifU has not been reported. Yet NifS-mediated Fe-S cluster reconstitutions in NifU were reported in DTT-based assays, which provide an idea of which domain binds Fe-S clusters. A truncated form of NifU containing only its N-terminal domain was shown to assemble a labile

[2Fe2S] cluster, as observed for IscU/ISCU [202]. Time-course experiments further suggested that this [2Fe2S] is converted into a [4Fe4S] cluster by reductive coupling [38]. However, as these reactions were performed with DTT as a reductant, it is still unclear whether assembly of [4Fe4S] clusters by the N-terminal domain is physiologically relevant. Moreover, no reductase has been identified in the NIF operon that could achieve the reduction of a persulfide transferred to NifU. An appealing hypothesis is that the permanent [2Fe2S] cluster of the central domain of NifU fills up this function, as described for FDX2. NifU may thus combine the functions of IscU/ISCU and Fdx/FDX2 within the same polypeptide for the biosynthesis of [2Fe2S] clusters.

Fe–S cluster reconstitution assays with the full-length NifU protein afforded evidence that the NifU domain binds [4Fe4S] clusters [38]. The formation of [4Fe4S] clusters is supposed to proceed via reductive coupling of two [2Fe2S] clusters and ferredoxin is able to catalyze this type of reaction [203]. As no reductase has been identified in the NIF operon, the permanent [2Fe2S] cluster of NifU may also fulfill this function. Thereby, the permanent [2Fe2S] cluster might play a bifunctional role, in persulfide reduction and in reductive coupling of the [2Fe2S] clusters. This process would require an external reductase to deliver electrons to the permanent [2Fe2S] cluster, but as for the ISC machinery, this reductase may not be encoded by the NIF operon. In analogy with NifU homologs that are involved in the assembly and/or transfer of [4Fe4S] clusters, the NifU domain of NifU might be the place for reductive coupling of the [2Fe2S] clusters leading to formation of the [4Fe4S] cluster [6].

5. Fe–S Assembly by the SUF Machinery

5.1. Overall Description of the SUF Machinery

There are several striking differences between the ISC and SUF machineries that are likely related to the higher resistance of the SUF machinery under stress conditions [26]. As the description of the SUF machinery has been extensively reviewed in other reports, the reader is referred to these reviews for more details [26,47,204]. We attempt, here, to focus on comparative elements between the ISC and SUF machineries.

Like the ISC machinery, the genes encoding the components of the SUF machinery are organized in operons [47]. The SUF system contains two to six genes depending on the organisms. The main components are SufS, the cysteine desulfurase providing sulfur and a scaffolding complex formed by the SufB, SufD and SufC proteins. Complexes containing various stoichiometries of the SufB, SufD and SufC proteins can be isolated by mixing the purified proteins *in vitro*, but the physiologically active complex is most likely a SufBC₂D complex [26,205]. The crystal structure of the SufBC₂D complex shows that SufB and SufD form a heterodimer with two SufC proteins bound to each subunit [206]. The site of Fe–S cluster assembly has been localized at the interface of the SufB–SufD heterodimer with Cys405, Glu434 or Glu432 and His433 from SufB and His360 from SufD as putative ligands of the Fe–S cluster [26]. SufC is an ATPase that drives structural changes to the SufB–SufD complex for proper Fe–S cluster assembly. The SUF operons also encode SufE or SufU, two sulfur relay proteins shuttling the persulfide generated by SufS to the scaffolding complex. SufE and SufU occur in a mutually exclusive manner in bacterial genomes and can complement each other, which indicates that they play very similar roles [47,207–210].

The persulfide transfer processes involving SufE or SufU have been particularly well studied. In contrast, it is still unclear how and where iron is inserted in the SufBC₂D scaffold and whether or not persulfide supply is coupled with the presence of iron as observed with the ISC machinery. The mechanism of persulfide reduction is also still elusive.

5.2. Iron Insertion in the SufBC₂D Scaffold

The few data available on the process of iron insertion in the SufBC₂D complex suggest distinct mechanisms for the ISC and SUF machineries. Strains lacking SufC are impaired in the utilization of iron and a specific disruption of the ATPase activity of SufC lowers the iron content of the SufBC₂D

complex in vivo [211,212]. These data raise the possibility that SufC is important for iron acquisition by the SufBC₂D complex. An active process relying on the ATPase activity of SufC may provide a rationale to the higher ability of the SUF machinery to cope with iron-poor conditions, as compared to the ISC machinery for which a passive mode of iron insertion is postulated (see Section 3.1.2). Moreover, the SufBC₂D complex was proposed to function as a reductase of ferric iron [205,211]. The SufBC₂D complex isolated from *E. coli* co-purifies with one molecule of reduced FADH₂ per complex. This FADH₂ was shown to mobilize iron from ferric citrate and the ferric-loaded form of CyaY. This suggests that the SUF system is able to mobilize the poorly soluble ferric iron, which could provide a significant advantage under iron-poor conditions. However, the iron-binding site in the SufBC₂D complex has not been yet identified to test these hypotheses.

5.3. Sulfur Insertion in the SufBC₂D Complex

5.3.1. SufS, the Source of Sulfur

SufS belongs to the class II of the desulfurase family that are characterized by a shorter flexible loop carrying the catalytic cysteine [26]. The formation of the persulfide is also slower in class II than in class I, but accelerated by binding of SufU or SufE [26,213]. The reduction of the persulfide of SufS by thiols is apparently rate-limiting as for class I, which emphasizes that the persulfide is largely excluded from solvent [208,213–215]. Thereby, sulfur delivery is confined to the surrounding of the PLP-binding pocket and specific sulfur acceptors (SufE, SufU) are needed to mediate sulfur transfer to the SufBC₂D complex, most likely to ensure shielding of the persulfide.

5.3.2. Sulfur Transfer via SufE

SufE was shown to accept sulfur from SufS on its highly conserved cysteine residue, Cys51 [214,216]. The trans-persulfuration reaction relies on mutual changes in the structure of SufE and SufS [217–224]. The crystal structures of SufE show that the Cys51 is initially buried and protected from the solvent in a hydrophobic pocket [225,226]. Although there is still no tri-dimensional structure of the SufS–SufE complex, deuterium exchange experiments and comparison with the structure of the closely related homolog CsdA–CsdE complex have provided information on the mechanism of persulfide transfer [217–224]. Upon binding of CsdE to CsdA, the loop of CsdE carrying the receptor cysteine is twisted and comes in close proximity of the catalytic cysteine of CsdA, a similar remodeling is hypothesized for the SufS–SufE complex that would facilitate the nucleophilic attack by Cys51 of SufE. In addition, local changes in the SufS catalytic site and dimer interface may promote the desulfurase reaction and an outward-facing position of the persulfidated Cys364. This could provide a way to couple persulfide formation with its transfer. Upon dissociation of the SufS–SufE complex, the persulfide transferred to SufE is protected from the solvent most likely through a backward movement of the flexible to the hydrophobic cavity [225–227].

5.3.3. Sulfur Transfer via SufU

Due to its high homology with IscU/ISCU, SufU was initially proposed to function as a scaffold for Fe–S cluster assembly [209,228]. However, SufU cannot complement the lack of IscU/ISCU, which indicates that these proteins have different roles [159,207,210]. The main structural differences between SufU and IscU/ISCU are an insertion of 18–21 residues between the second and third cysteine residues and the lack of the well-conserved histidine H103 [23]. Since SufU accepts a persulfide from SufS, the current view is that SufU is a sulfurtransferase, as SufE, that conveys the persulfide from SufS to the SufBC₂D complex [208,228,229].

Interestingly, SufU hosts a tightly bound zinc ion that is essential for persulfide transfer [159,230,231]. The structure of SufU proteins revealed that the zinc ion is coordinated in a tetrahedral geometry by the three cysteines Cys41, Cys66, and Cys128 and the aspartate Asp43 (Figure 12A) [230,231]. These residues are equivalent to Cys35, Cys61, Cys104 and the aspartate Asp37 in IscU/ISCU. Upon formation of a

complex with SufS, SufU and SufS undergo major structural changes (Figure 12B) [232,233]. The mobile loop of SufS carrying the catalytic cysteine Cys361 moves freely and the histidine residue His342 of SufS becomes a ligand of the zinc ion of SufU by swapping with the cysteine C41. Consequently, Cys41 is released and directed toward Cys361 of SufS. Soaking of the crystals of the SufS–SufU complex with L-cysteine leads to extra electronic densities at Cys361 and Cys41 consistent with cysteine persulfides, thus suggesting that persulfide transfer occurs between these residues [232].

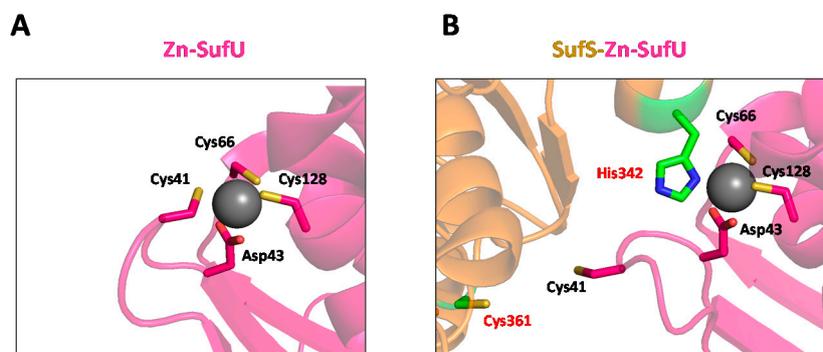


Figure 12. Structural rearrangement at the zinc site of SufU upon binding of SufS. Zoom on the zinc site of (A) *Bacillus subtilis* SufU (PDB 6JZV) and (B) *Bacillus subtilis* SufS–SufU complex (PDB 5XT5). SufU is colored in pink with key amino acids coordinating the zinc ion (Cys41, Asp43, Cys66 and Cys128) and SufS in orange with its catalytic cysteine Cys361 in green. The zinc ion is initially coordinated by Cys41, Asp43, Cys66 and Cys128 of SufU. Upon binding to SufS, His342 of SufS exchanges with Cys41, which comes close by Cys361, the catalytic cysteine of SufS.

This metal-dependent process is reminiscent of the persulfide transfer reaction reported for the NFS1–ISCU complex (Figure 2), but is mechanistically different. The main difference relates to the shorter length of the flexible loop carrying the catalytic cysteine in SufS that does not allow persulfide transfer to the distal cysteine (Cys128) but to a proximal one (Cys41) that is released upon binding of His342 to the zinc ion. This highlights two different ways of using a metal ion for persulfide transfer. In IscU/ISCU, the metal center anchors the persulfide of the desulfurase in close proximity of the receptor cysteine while in SufU, ligand exchange at the metal center expels the receptor cysteine and drives it close to the catalytic cysteine.

5.4. Persulfide Transfer to SufBC₂D and Reduction via FADH₂?

SufE interacts with the SufBC₂D complex and the cysteine Cys254 has been proposed as the primary acceptor in SufB [26,51,227,234]. Then this persulfide would be conveyed to the cysteine Cys405 of SufB through a hydrophobic tunnel involving non-cysteine amino acids as sulfur relays [26,206,234]. In contrast to the ISC machinery, there is, as of yet, no indication that iron is involved or required for persulfide transfer between SufE and SufB and within SufB. Moreover, the assembly site in the SufBC₂D complex is 20 Å away from the entry point of sulfur on Cys254, it is thus still unclear how sulfur insertion could be coupled with presence of iron in the SufBC₂D complex. The sulfur transfer process from SufU to SufBC₂D has not been investigated yet, whether SufU transfers its persulfide to Cys254 as SufE is not known.

The SUF operon does not encode any obvious reductase that could play a role in persulfide reduction. Moreover, *E. coli* strains lacking Fdx that are thus defective in ISC-driven Fe–S cluster assembly, are viable. This indicates that the SUF machinery is active under these conditions and thus that Fdx is not the reductase of this machinery. Therefore, another reductase dedicated to the SUF operon should exist [168,170]. As mentioned above, the SufBC₂D complex isolated from *E. coli* co-purifies with one molecule of reduced FADH₂ per complex [205,211]. Although this cofactor is

proposed to operate as a ferric reductase, it may also provide reducing equivalents for the reduction of the persulfide transferred to the SufBC₂D complex.

6. Concluding Remarks

The recent advances in the field of Fe–S cluster biogenesis have shed new light on the process of their assembly. We are now close to provide a complete picture for the assembly of [2Fe2S] clusters by the ISC machinery. Two key primary steps have been uncovered with the mouse system: persulfide transfer to ISCU and its reduction by FDX2 that are both metal-dependent. This process is most likely conserved in bacteria, but this is still awaiting confirmation. In the first step, iron comes first and enables persulfide insertion in IscU/ISCU. In the second step, persulfide reduction is coupled to the presence of iron. Altogether, these metal dependent steps probably allow allocation of the proper amount of sulfur to the iron center of IscU/ISCU and coordinate sulfide release with the presence of iron to generate the first iron-sulfide link. However, a number of key questions remain to be solved, essentially the mechanism by which persulfide transfer and its reduction are coupled with iron and how the mononuclear center of IscU/ISCU is converted into a dinuclear center to form the [2Fe2S] cluster. By unravelling the primary steps of Fe–S cluster assembly, the functional role of frataxin is also becoming more clear. There is now compelling evidence pointing to a role of frataxin as a kinetic modulator of persulfide transfer.

Since the ISC and NIF systems are very similar in several ways, the data accumulated on the ISC system will likely help unravel the mechanism by which the NIF machinery assembles Fe–S clusters. In contrast, the comparisons of the ISC and SUF systems point to major differences. The persulfide transfer process in the SUF systems is split into discrete steps involving sulfur relay proteins and a trans-persulfuration reaction with the SufBC₂D complex. In the first step, a buried area is created at the interface of the SufS–SufE/U complex, to achieve the trans-persulfuration reaction. This protected area probably shields the persulfide and the reactive cysteines from oxidants. The iron-insertion process also seems very different, but its description is still too elusive to allow a clear description. Several other questions are pending, essentially whether persulfide transfer is coupled with iron insertion, how the persulfide is reduced into sulfide and how the [2Fe2S] cluster is formed. Addressing these questions will improve our understanding of the mechanism by which the SUF machinery copes with iron-poor and oxidative-stress conditions.

Author Contributions: B.D., supervision and review-writing; B.S. writing contributions; S.G., writing contributions, bibliographic resources; B.M., text corrections. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ANR grant (Frataxur, ANR-17-CE11-0021-01) and FARA grant (202212) awarded to B.D., B.M. was funded by FARA grant (202212).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Camprubi, E.; Jordan, S.F.; Vasiliadou, R.; Lane, N. Iron catalysis at the origin of life. *IUBMB Life* **2017**, *69*, 373–381. [[CrossRef](#)]
2. Huber, C.; Wachtershauser, G. Alpha-Hydroxy and alpha-amino acids under possible Hadean, volcanic origin-of-life conditions. *Science* **2006**, *314*, 630–632. [[CrossRef](#)]
3. Cody, G. Transition metal sulfides and the origin of metabolism. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2004**, *32*, 569–599. [[CrossRef](#)]
4. Martin, W.; Russell, M.J. On the origins of cells: A hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, *358*, 59–83, discussion 55–83. [[CrossRef](#)]
5. Chahal, H.K.; Boyd, J.M.; Outten, F.W. Iron–Sulfur Cluster Biogenesis in Archaea and Bacteria. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; Scott, R.A., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2013. [[CrossRef](#)]

6. Lill, R.; Freibert, S.A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2020**, *89*, 471–499. [[CrossRef](#)]
7. Paul, V.D.; Lill, R. Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1528–1539. [[CrossRef](#)]
8. Przybyla-Tosciano, J.; Roland, M.; Gaymard, F.; Couturier, J.; Rouhier, N. Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 545–566. [[CrossRef](#)]
9. Roche, B.; Aussel, L.; Ezraty, B.; Mandin, P.; Py, B.; Barras, F. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1827*, 455–469. [[CrossRef](#)]
10. Martin, D.; Charpilienne, A.; Parent, A.; Boussac, A.; D'Autreaux, B.; Poupon, J.; Poncet, D. The rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe–2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1074–1083. [[CrossRef](#)]
11. Tam, W.; Pell, L.G.; Bona, D.; Tsai, A.; Dai, X.X.; Edwards, A.M.; Hendrix, R.W.; Maxwell, K.L.; Davidson, A.R. Tail tip proteins related to bacteriophage lambda gpL coordinate an iron-sulfur cluster. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2450–2462. [[CrossRef](#)]
12. Tsang, S.H.; Wang, R.; Nakamaru-Ogiso, E.; Knight, S.A.; Buck, C.B.; You, J. The Oncogenic Small Tumor Antigen of Merkel Cell Polyomavirus Is an Iron-Sulfur Cluster Protein That Enhances Viral DNA Replication. *J. Virol.* **2016**, *90*, 1544–1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Estellon, J.; Ollagnier de Choudens, S.; Smadja, M.; Fontecave, M.; Vandenbrouck, Y. An integrative computational model for large-scale identification of metalloproteins in microbial genomes: A focus on iron-sulfur cluster proteins. *Metallomics* **2014**, *6*, 1913–1930. [[CrossRef](#)]
14. Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4366–4469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stegmaier, K.; Blinn, C.M.; Bechtel, D.F.; Greth, C.; Auerbach, H.; Muller, C.S.; Jakob, V.; Reijerse, E.J.; Netz, D.J.A.; Schunemann, V.; et al. Apd1 and Aim32 Are Prototypes of Bishistidinyl-Coordinated Non-Rieske [2Fe–2S] Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5753–5765. [[CrossRef](#)]
16. Berkovitch, F.; Nicolet, Y.; Wan, J.T.; Jarrett, J.T.; Drennan, C.L. Crystal Structure of Biotin Synthase, an S-Adenosylmethionine-Dependent Radical Enzyme. *Science* **2004**, *303*, 76. [[CrossRef](#)]
17. Bak, D.W.; Elliott, S.J. Alternative FeS cluster ligands: Tuning redox potentials and chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 50–58. [[CrossRef](#)]
18. Hu, Y.; Ribbe, M.W. Biosynthesis of the Metalloclusters of Nitrogenases. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 455–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dobbek, H.; Svetlitchnyi, V.; Gremer, L.; Huber, R.; Meyer, O. Crystal Structure of a Carbon Monoxide Dehydrogenase Reveals a [Ni–4Fe–5S] Cluster. *Science* **2001**, *293*, 1281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Cooper, S.J.; Garner, C.D.; Hagen, W.R.; Lindley, P.F.; Bailey, S. Hybrid-cluster protein (HCP) from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) at 1.6 Å resolution. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15044–15054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Beinert, H. Iron-sulfur proteins: Ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 2–15. [[CrossRef](#)]
22. Blanc, B.; Gerez, C.; Ollagnier de Choudens, S. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1436–1447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gervason, S.; Larkem, D.; Mansour, A.B.; Botzanowski, T.; Muller, C.S.; Pecqueur, L.; Le Pavec, G.; Delaunay-Moisan, A.; Brun, O.; Agramunt, J.; et al. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Webert, H.; Freibert, S.A.; Gallo, A.; Heidenreich, T.; Linne, U.; Amlacher, S.; Hurt, E.; Muhlenhoff, U.; Banci, L.; Lill, R. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ciofi-Baffoni, S.; Nasta, V.; Banci, L. Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics* **2018**, *10*, 49–72. [[CrossRef](#)]
26. Pérard, J.; Ollagnier de Choudens, S. Iron-sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: Close to the molecular mechanism understanding. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 581–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rouault, T.A.; Maio, N. Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 12744–12753. [[CrossRef](#)]

28. Delewski, W.; Paterkiewicz, B.; Manicki, M.; Schilke, B.; Tomiczek, B.; Ciesielski, S.J.; Nierzwicki, L.; Czub, J.; Dutkiewicz, R.; Craig, E.A.; et al. Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Chaperones: Evidence for Emergence of Mutational Robustness of a Highly Specific Protein-Protein Interaction. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 643–656. [[CrossRef](#)]
29. Beilschmidt, L.K.; Ollagnier de Choudens, S.; Fournier, M.; Sanakis, I.; Hograindleur, M.A.; Clemancey, M.; Blondin, G.; Schmucker, S.; Eisenmann, A.; Weiss, A.; et al. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe₄S₄ biogenesis in vivo. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15124. [[CrossRef](#)]
30. Brancaccio, D.; Gallo, A.; Mikolajczyk, M.; Zovo, K.; Palumaa, P.; Novellino, E.; Piccioli, M.; Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L. Formation of [4Fe–4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16240–16250. [[CrossRef](#)]
31. Brancaccio, D.; Gallo, A.; Piccioli, M.; Novellino, E.; Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L. [4Fe–4S] Cluster Assembly in Mitochondria and Its Impairment by Copper. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 719–730. [[CrossRef](#)]
32. Muhlenhoff, U.; Richter, N.; Pines, O.; Pierik, A.J.; Lill, R. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe–4S] proteins. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 41205–41216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Weiler, B.D.; Bruck, M.C.; Kothe, I.; Bill, E.; Lill, R.; Muhlenhoff, U. Mitochondrial [4Fe–4S] protein assembly involves reductive [2Fe–2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 20555–20565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jacobson, M.R.; Cash, V.L.; Weiss, M.C.; Laird, N.F.; Newton, W.E.; Dean, D.R. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *219*, 49–57. [[CrossRef](#)]
35. Zheng, L.; White, R.H.; Cash, V.L.; Jack, R.F.; Dean, D.R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2754–2758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fu, W.; Jack, R.F.; Morgan, T.V.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe–2S] clusters. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13455–13463. [[CrossRef](#)]
37. Johnson, D.C.; Dos Santos, P.C.; Dean, D.R. NifU and NifS are required for the maturation of nitrogenase and cannot replace the function of isc-gene products in *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 90–93. [[CrossRef](#)]
38. Smith, A.D.; Jameson, G.N.; Dos Santos, P.C.; Agar, J.N.; Naik, S.; Krebs, C.; Frazzon, J.; Dean, D.R.; Huynh, B.H.; Johnson, M.K. NifS-mediated assembly of [4Fe–4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12955–12969. [[CrossRef](#)]
39. Black, K.A.; Dos Santos, P.C. Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1470–1480. [[CrossRef](#)]
40. Leimkühler, S.; Bühning, M.; Beilschmidt, L. Shared Sulfur Mobilization Routes for tRNA Thiolation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Prokaryotes and Eukaryotes. *Biomolecules* **2017**, *7*, 5.
41. Zheng, L.; Cash, V.L.; Flint, D.H.; Dean, D.R. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13264–13272. [[CrossRef](#)]
42. Patzer, S.I.; Hantke, K. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe–2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3307–3309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mihara, H.; Kurihara, T.; Yoshimura, T.; Esaki, N. Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: Mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 559–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nachin, L.; El Hassouni, M.; Loiseau, L.; Expert, D.; Barras, F. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: The key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 960–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Takahashi, Y.; Tokumoto, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28380–28383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nyvltova, E.; Sutak, R.; Harant, K.; Sedinova, M.; Hrdy, I.; Paces, J.; Vlcek, C.; Tachezy, J. NIF-type iron-sulfur cluster assembly system is duplicated and distributed in the mitochondria and cytosol of *Mastigamoeba balamuthi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7371–7376. [[CrossRef](#)]

47. Garcia, P.S.; Gribaldo, S.; Py, B.; Barras, F. The SUF system: An ABC ATPase-dependent protein complex with a role in Fe–S cluster biogenesis. *Res. Microbiol.* **2019**, *170*, 426–434. [[CrossRef](#)]
48. Freibert, S.A.; Goldberg, A.V.; Hacker, C.; Molik, S.; Dean, P.; Williams, T.A.; Nakjang, S.; Long, S.; Sendra, K.; Bill, E.; et al. Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 13932. [[CrossRef](#)]
49. Couturier, J.; Touraine, B.; BRIAT, J.-F.; Gaymard, F.; Rouhier, N. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–22. [[CrossRef](#)]
50. Balk, J.; Schaedler, T.A. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65*, 125–153. [[CrossRef](#)]
51. Dai, Y.; Outten, F.W. The E. coli SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 4016–4022. [[CrossRef](#)]
52. Trotter, V.; Vinella, D.; Loiseau, L.; Ollagnier de Choudens, S.; Fontecave, M.; Barras, F. The CsdA cysteine desulphurase promotes Fe/S biogenesis by recruiting Suf components and participates to a new sulphur transfer pathway by recruiting CsdL (ex-YgdL), a ubiquitin-modifying-like protein. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 1527–1542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fosset, C.; Chauveau, M.J.; Guillon, B.; Canal, F.; Drapier, J.C.; Bouton, C. RNA silencing of mitochondrial m-Nfs1 reduces Fe–S enzyme activity both in mitochondria and cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25398–25406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kispal, G.; Csere, P.; Prohl, C.; Lill, R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **1999**, *18*, 3981–3989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Marelja, Z.; Stocklein, W.; Nimtz, M.; Leimkuhler, S. A novel role for human Nfs1 in the cytoplasm: Nfs1 acts as a sulfur donor for MOCS3, a protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25178–25185. [[CrossRef](#)]
56. Muhlenhoff, U.; Balk, J.; Richhardt, N.; Kaiser, J.T.; Sipos, K.; Kispal, G.; Lill, R. Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36906–36915. [[CrossRef](#)]
57. Pandey, A.K.; Pain, J.; Dancis, A.; Pain, D. Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 9489–9502. [[CrossRef](#)]
58. Pastore, A.; Puccio, H. Frataxin: A protein in search for a function. *J. Neurochem.* **2013**, *126* (Suppl. S1), 43–52. [[CrossRef](#)]
59. Roche, B.; Huguenot, A.; Barras, F.; Py, B. The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe–S biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2015**, *95*, 605–623. [[CrossRef](#)]
60. Van Vranken, J.G.; Nowinski, S.M.; Clowers, K.J.; Jeong, M.Y.; Ouyang, Y.; Berg, J.A.; Gygi, J.P.; Gygi, S.P.; Winge, D.R.; Rutter, J. ACP Acylation Is an Acetyl-CoA-Dependent Modification Required for Electron Transport Chain Assembly. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 567–580 e564. [[CrossRef](#)]
61. Agar, J.N.; Krebs, C.; Frazzon, J.; Huynh, B.H.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe–2S] and [4Fe–4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7856–7862. [[CrossRef](#)]
62. Mansy, S.S.; Wu, G.; Surerus, K.K.; Cowan, J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Thermatoga maritima* IscU is a structured iron-sulfur cluster assembly protein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21397–21404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Raulfs, E.C.; O’Carroll, I.P.; Dos Santos, P.C.; Unciuleac, M.C.; Dean, D.R. In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8591–8596. [[CrossRef](#)]
64. Shimomura, Y.; Wada, K.; Fukuyama, K.; Takahashi, Y. The asymmetric trimeric architecture of [2Fe–2S] IscU: Implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 133–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bonomi, F.; Iametti, S.; Morleo, A.; Ta, D.; Vickery, L.E. Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange. *Biochemistry* **2011**, *50*, 9641–9650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Marinoni, E.N.; de Oliveira, J.S.; Nicolet, Y.; Amara, P.; Dean, D.R.; Fontecilla-Camps, J.C. (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into Fe₂S₂ biogenesis and transfer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 5439–5442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Boniecki, M.T.; Freibert, S.A.; Muhlenhoff, U.; Lill, R.; Cygler, M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1287. [[CrossRef](#)]

68. Fox, N.G.; Martelli, A.; Nabhan, J.F.; Janz, J.; Borkowska, O.; Bulawa, C.; Yue, W.W. Zinc(II) binding on human wild-type ISCU and Met140 variants modulates NFS1 desulfurase activity. *Biochimie* **2018**, *152*, 211–218. [[CrossRef](#)]
69. Iannuzzi, C.; Adrover, M.; Puglisi, R.; Yan, R.; Temussi, P.A.; Pastore, A. The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 1208–1219. [[CrossRef](#)]
70. Kim, J.H.; Fuzery, A.K.; Tonelli, M.; Ta, D.T.; Westler, W.M.; Vickery, L.E.; Markley, J.L. Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6062–6071. [[CrossRef](#)]
71. Ramelot, T.A.; Cort, J.R.; Goldsmith-Fischman, S.; Kornhaber, G.J.; Xiao, R.; Shastry, R.; Acton, T.B.; Honig, B.; Montelione, G.T.; Kennedy, M.A. Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site. *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 567–583. [[CrossRef](#)]
72. Yan, R.; Kelly, G.; Pastore, A. The scaffold protein IscU retains a structured conformation in the Fe–S cluster assembly complex. *ChemBiochem* **2014**, *15*, 1682–1686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Fox, N.G.; Yu, X.; Feng, X.; Bailey, H.J.; Martelli, A.; Nabhan, J.F.; Strain-Damerell, C.; Bulawa, C.; Yue, W.W.; Han, S. Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2210. [[CrossRef](#)]
74. Bertini, I.; Cowan, J.A.; Del Bianco, C.; Luchinat, C.; Mansy, S.S. Thermotoga maritima IscU. Structural characterization and dynamics of a new class of metallochaperone. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 907–924. [[CrossRef](#)]
75. Cai, K.; Frederick, R.O.; Kim, J.H.; Reinen, N.M.; Tonelli, M.; Markley, J.L. Human mitochondrial chaperone (mtHSP70) and cysteine desulfurase (NFS1) bind preferentially to the disordered conformation, whereas co-chaperone (HSC20) binds to the structured conformation of the iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 28755–28770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Mansy, S.S.; Wu, S.P.; Cowan, J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis: Biochemical characterization of the conformational dynamics of Thermotoga maritima IscU and the relevance for cellular cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10469–10475. [[CrossRef](#)]
77. Kim, J.H.; Tonelli, M.; Markley, J.L. Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 454–459. [[CrossRef](#)]
78. Lin, C.W.; McCabe, J.W.; Russell, D.H.; Barondeau, D.P. Molecular Mechanism of ISC Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Revealed by High-Resolution Native Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 6018–6029. [[CrossRef](#)]
79. Lewis, B.E.; Mason, Z.; Rodrigues, A.V.; Nuth, M.; Dizin, E.; Cowan, J.A.; Stemmler, T.L. Unique roles of iron and zinc binding to the yeast Fe–S cluster scaffold assembly protein “Isu1”. *Metallomics* **2019**, *11*, 1820–1835. [[CrossRef](#)]
80. Rodrigues, A.V.; Kandegedara, A.; Rotondo, J.A.; Dancis, A.; Stemmler, T.L. Iron loading site on the Fe–S cluster assembly scaffold protein is distinct from the active site. *Biometals* **2015**, *28*, 567–576. [[CrossRef](#)]
81. Dzul, S.P.; Rocha, A.G.; Rawat, S.; Kandegedara, A.; Kusowski, A.; Pain, J.; Murari, A.; Pain, D.; Dancis, A.; Stemmler, T.L. In vitro characterization of a novel Isu homologue from *Drosophila melanogaster* for de novo FeS-cluster formation. *Metallomics* **2017**, *9*, 48–60. [[CrossRef](#)]
82. Adamec, J.; Rusnak, F.; Owen, W.G.; Naylor, S.; Benson, L.M.; Gacy, A.M.; Isaya, G. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: Implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *67*, 549–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Cavadini, P.; O’Neill, H.A.; Benada, O.; Isaya, G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 217–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ding, H.; Yang, J.; Coleman, L.C.; Yeung, S. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7997–8004. [[CrossRef](#)]
85. Gakh, O.; Adamec, J.; Gacy, A.M.; Twesten, R.D.; Owen, W.G.; Isaya, G. Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6798–6804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Layer, G.; Ollagnier-de Choudens, S.; Sanakis, Y.; Fontecave, M. Iron-sulfur cluster biosynthesis: Characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe–2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16256–16263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Yoon, T.; Cowan, J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe–2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6078–6084. [[CrossRef](#)]

88. Parent, A.; Elduque, X.; Cornu, D.; Belot, L.; Le Caer, J.P.; Grandas, A.; Toledano, M.B.; D'Autreaux, B. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5686. [[CrossRef](#)]
89. Patra, S.; Barondeau, D.P. Mechanism of activation of the human cysteine desulfurase complex by frataxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 19421–19430. [[CrossRef](#)]
90. Armas, A.M.; Balparda, M.; Terenzi, A.; Busi, M.V.; Pagani, M.A.; Gomez-Casati, D.F. Ferrocyclase activity of plant frataxin. *Biochimie* **2019**, *156*, 118–122. [[CrossRef](#)]
91. Bellanda, M.; Maso, L.; Doni, D.; Bortolus, M.; De Rosa, E.; Lunardi, F.; Alfonsi, A.; Noguera, M.E.; Herrera, M.G.; Santos, J.; et al. Exploring iron-binding to human frataxin and to selected Friedreich ataxia mutants by means of NMR and EPR spectroscopies. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 140254. [[CrossRef](#)]
92. Cai, K.; Frederick, R.O.; Tonelli, M.; Markley, J.L. Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe–S cluster assembly. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *183*, 107–116. [[CrossRef](#)]
93. Castro, I.H.; Pignataro, M.F.; Sewell, K.E.; Espeche, L.D.; Herrera, M.G.; Noguera, M.E.; Dain, L.; Nadra, A.D.; Aran, M.; Smal, C.; et al. Frataxin Structure and Function. *Subcell Biochem.* **2019**, *93*, 393–438.
94. Gakh, O.; Ranatunga, W.; Galeano, B.K.; Smith, D.S.T.; Thompson, J.R.; Isaya, G. Defining the Architecture of the Core Machinery for the Assembly of Fe–S Clusters in Human Mitochondria. *Methods Enzymol.* **2017**, *595*, 107–160.
95. Galeano, B.K.; Ranatunga, W.; Gakh, O.; Smith, D.Y.; Thompson, J.R.; Isaya, G. Zinc and the iron donor frataxin regulate oligomerization of the scaffold protein to form new Fe–S cluster assembly centers. *Metallomics* **2017**, *9*, 773–801. [[CrossRef](#)]
96. Ranatunga, W.; Gakh, O.; Galeano, B.K.; Smith, D.Y.T.; Soderberg, C.A.; Al-Karadaghi, S.; Thompson, J.R.; Isaya, G. Architecture of the Yeast Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Assembly Machinery: The Sub-Complex Formed by the Iron Donor, Yfh1 Protein, and the Scaffold, Isu1 Protein. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 10378–10398. [[CrossRef](#)]
97. Babcock, M.; de Silva, D.; Oaks, R.; Davis-Kaplan, S.; Jiralerspong, S.; Montermini, L.; Pandolfo, M.; Kaplan, J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **1997**, *276*, 1709–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Duby, G.; Foury, F.; Ramazzotti, A.; Herrmann, J.; Lutz, T. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2635–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Foury, F.; Cazzalini, O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **1997**, *411*, 373–377. [[CrossRef](#)]
100. Puccio, H.; Simon, D.; Cossee, M.; Criqui-Filipe, P.; Tiziano, F.; Melki, J.; Hindelang, C.; Matyas, R.; Rustin, P.; Koenig, M. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe–S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 181–186. [[CrossRef](#)]
101. Rotig, A.; de Lonlay, P.; Chretien, D.; Foury, F.; Koenig, M.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rustin, P. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 215–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Gerber, J.; Muhlenhoff, U.; Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 906–911. [[CrossRef](#)]
103. Ramazzotti, A.; Vanmansart, V.; Foury, F. Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 215–220. [[CrossRef](#)]
104. Schmucker, S.; Martelli, A.; Colin, F.; Page, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Reutenauer, L.; Puccio, H. Mammalian frataxin: An essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Prischi, F.; Konarev, P.V.; Iannuzzi, C.; Pastore, C.; Adinolfi, S.; Martin, S.R.; Svergun, D.I.; Pastore, A. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 95. [[CrossRef](#)]
106. Campuzano, V.; Montermini, L.; Molto, M.D.; Pianese, L.; Cossee, M.; Cavalcanti, F.; Monros, E.; Rodius, F.; Duclos, F.; Monticelli, A.; et al. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **1996**, *271*, 1423–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

107. Sanchez-Casis, G.; Cote, M.; Barbeau, A. Pathology of the heart in Friedreich's ataxia: Review of the literature and report of one case. *Can. J. Neurol. Sci.* **1976**, *3*, 349–354. [[CrossRef](#)]
108. Cook, J.D.; Bencze, K.Z.; Jankovic, A.D.; Crater, A.K.; Busch, C.N.; Bradley, P.B.; Stemmler, A.J.; Spaller, M.R.; Stemmler, T.L. Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7767–7777. [[CrossRef](#)]
109. O'Neill, H.A.; Gakh, O.; Isaya, G. Supramolecular assemblies of human frataxin are formed via subunit-subunit interactions mediated by a non-conserved amino-terminal region. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 433–439. [[CrossRef](#)]
110. Aloria, K.; Schilke, B.; Andrew, A.; Craig, E.A. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 1096–1101. [[CrossRef](#)]
111. Schmucker, S.; Argentini, M.; Carelle-Calmels, N.; Martelli, A.; Puccio, H. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 3521–3531. [[CrossRef](#)]
112. Seguin, A.; Sutak, R.; Bulteau, A.L.; Garcia-Serres, R.; Oddou, J.L.; Lefevre, S.; Santos, R.; Dancis, A.; Camadro, J.M.; Latour, J.M.; et al. Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 531–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Muhlenhoff, U.; Richhardt, N.; Ristow, M.; Kispal, G.; Lill, R. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2025–2036. [[CrossRef](#)]
114. Stehling, O.; Wilbrecht, C.; Lill, R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* **2014**, *100*, 61–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Adinolfi, S.; Nair, M.; Politou, A.; Bayer, E.; Martin, S.; Temussi, P.; Pastore, A. The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: How to increase a protein's stability. *Biochemistry* **2004**, *43*, 6511–6518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Bou-Abdallah, F.; Adinolfi, S.; Pastore, A.; Laue, T.M.; Dennis Chasteen, N. Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 605–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Yoon, T.; Dizin, E.; Cowan, J.A. N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: Regulation of iron binding and complex formation with target proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 535–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Huang, J.; Dizin, E.; Cowan, J.A. Mapping iron binding sites on human frataxin: Implications for cluster assembly on the ISU Fe–S cluster scaffold protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 825–836. [[CrossRef](#)]
119. Ding, B.; Smith, E.S.; Ding, H. Mobilization of the iron centre in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 797–802. [[CrossRef](#)]
120. Ding, H.; Clark, R.J.; Ding, B. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37499–37504. [[CrossRef](#)]
121. Lu, J.; Bitoun, J.P.; Tan, G.; Wang, W.; Min, W.; Ding, H. Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIscA1. *Biochem. J.* **2010**, *428*, 125–131. [[CrossRef](#)]
122. Lu, J.; Yang, J.; Tan, G.; Ding, H. Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in Escherichia coli. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 535–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Yang, J.; Bitoun, J.P.; Ding, H. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27956–27963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Ding, H.; Clark, R.J. Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem. J.* **2004**, *379*, 433–440. [[CrossRef](#)]
125. Mapolelo, D.T.; Zhang, B.; Naik, S.G.; Huynh, B.H.; Johnson, M.K. Spectroscopic and functional characterization of iron-bound forms of Azotobacter vinelandii (Nif)IscA. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8056–8070. [[CrossRef](#)]
126. Gupta, V.; Sendra, M.; Naik, S.G.; Chahal, H.K.; Huynh, B.H.; Outten, F.W.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. Native Escherichia coli SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe–2S] protein and acts as an Fe–S transporter to Fe–S target enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6149–6153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Morimoto, K.; Yamashita, E.; Kondou, Y.; Lee, S.J.; Arisaka, F.; Tsukihara, T.; Nakai, M. The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe–2S] cluster suggests the structural basis of the Fe–S cluster biosynthetic scaffold. *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 117–132. [[CrossRef](#)]

128. Wang, W.; Huang, H.; Tan, G.; Si, F.; Liu, M.; Landry, A.P.; Lu, J.; Ding, H. In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 429–436. [[CrossRef](#)]
129. Zeng, J.; Geng, M.; Jiang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Qiu, G. The IscA from *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an iron-sulfur protein which assemble the [Fe₄S₄] cluster with intracellular iron and sulfur. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *463*, 237–244. [[CrossRef](#)]
130. Mapolelo, D.T.; Zhang, B.; Randeniya, S.; Albetel, A.N.; Li, H.; Couturier, J.; Outten, C.E.; Rouhier, N.; Johnson, M.K. Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: Partners in Fe–S cluster trafficking. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 3107–3115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Kim, K.D.; Chung, W.H.; Kim, H.J.; Lee, K.C.; Roe, J.H. Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe–S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe–S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *392*, 467–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Gelling, C.; Dawes, I.W.; Richhardt, N.; Lill, R.; Muhlenhoff, U. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 1851–1861. [[CrossRef](#)]
133. Tokumoto, U.; Nomura, S.; Minami, Y.; Mihara, H.; Kato, S.; Kurihara, T.; Esaki, N.; Kanazawa, H.; Matsubara, H.; Takahashi, Y. Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **2002**, *131*, 713–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Al-Karadaghi, S.; Franco, R.; Hansson, M.; Shelnutt, J.A.; Isaya, G.; Ferreira, G.C. Chelatas: Distort to select? *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Foster, A.W.; Osman, D.; Robinson, N.J. Metal preferences and metallation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28095–28103. [[CrossRef](#)]
136. Capdevila, D.A.; Edmonds, K.A.; Giedroc, D.P. Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 177–200.
137. Philpott, C.C.; Jadhav, S. The ins and outs of iron: Escorting iron through the mammalian cytosol. *Free Radic Biol. Med.* **2019**, *133*, 112–117. [[CrossRef](#)]
138. Kruszewski, M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochim. Pol.* **2004**, *51*, 471–480. [[CrossRef](#)]
139. Wofford, J.D.; Bolaji, N.; Dziuba, N.; Outten, F.W.; Lindahl, P.A. Evidence that a respiratory shield in *Escherichia coli* protects a low-molecular-mass Fe(II) pool from O₂-dependent oxidation. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 50–62. [[CrossRef](#)]
140. Lindahl, P.A.; Moore, M.J. Labile Low-Molecular-Mass Metal Complexes in Mitochondria: Trials and Tribulations of a Burgeoning Field. *Biochemistry* **2016**, *55*, 4140–4153. [[CrossRef](#)]
141. McCormick, S.P.; Moore, M.J.; Lindahl, P.A. Detection of Labile Low-Molecular-Mass Transition Metal Complexes in Mitochondria. *Biochemistry* **2015**, *54*, 3442–3453. [[CrossRef](#)]
142. Moore, M.J.; Wofford, J.D.; Dancis, A.; Lindahl, P.A. Recovery of mrs3Δmrs4Δ *Saccharomyces cerevisiae* Cells under Iron-Sufficient Conditions and the Role of Fe580. *Biochemistry* **2018**, *57*, 672–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Hider, R.C.; Kong, X.L. Glutathione: A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals* **2011**, *24*, 1179–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Cupp-Vickery, J.R.; Urbina, H.; Vickery, L.E. Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1049–1059. [[CrossRef](#)]
145. Fujii, T.; Maeda, M.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Esaki, N.; Hata, Y. Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1263–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Kaiser, J.T.; Clausen, T.; Bourenkow, G.P.; Bartunik, H.D.; Steinbacher, S.; Huber, R. Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: Implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 451–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Nakamura, R.; Hikita, M.; Ogawa, S.; Takahashi, Y.; Fujishiro, T. Snapshots of PLP-substrate and PLP-product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes. *FEBS J.* **2020**, *287*, 1138–1154. [[CrossRef](#)]
148. Roret, T.; Pegeot, H.; Couturier, J.; Mulliert, G.; Rouhier, N.; Didierjean, C. X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **2014**, *70*, 1180–1185. [[CrossRef](#)]

149. Rybniker, J.; Pojer, F.; Marienhagen, J.; Kolly, G.S.; Chen, J.M.; van Gumpel, E.; Hartmann, P.; Cole, S.T. The cysteine desulfurase IscS of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and oxidative stress defence. *Biochem. J.* **2014**, *459*, 467–478. [[CrossRef](#)]
150. Shi, R.; Proteau, A.; Villarroya, M.; Moukadiri, I.; Zhang, L.; Trempe, J.F.; Matte, A.; Armengod, M.E.; Cygler, M. Structural basis for Fe–S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000354. [[CrossRef](#)]
151. Cory, S.A.; Van Vranken, J.G.; Brignole, E.J.; Patra, S.; Winge, D.R.; Drennan, C.L.; Rutter, J.; Barondeau, D.P. Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E5325–E5334. [[CrossRef](#)]
152. Turowski, V.R.; Busi, M.V.; Gomez-Casati, D.F. Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 1001–1010. [[CrossRef](#)]
153. Herrera, M.G.; Pignataro, M.F.; Noguera, M.E.; Cruz, K.M.; Santos, J. Rescuing the Rescuer: On the Protein Complex between the Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein and ISD11. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1455–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Smith, A.D.; Agar, J.N.; Johnson, K.A.; Frazzon, J.; Amster, I.J.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Sulfur transfer from IscS to IscU: The first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11103–11104. [[CrossRef](#)]
155. Urbina, H.D.; Silberg, J.J.; Hoff, K.G.; Vickery, L.E. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44521–44526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Smith, A.D.; Frazzon, J.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5236–5240. [[CrossRef](#)]
157. Nuth, M.; Yoon, T.; Cowan, J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis: Characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe–2S]²⁺ cluster core in IscU proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8774–8775. [[CrossRef](#)]
158. Bridwell-Rabb, J.; Fox, N.G.; Tsai, C.L.; Winn, A.M.; Barondeau, D.P. Human frataxin activates Fe–S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4904–4913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Selbach, B.P.; Chung, A.H.; Scott, A.D.; George, S.J.; Cramer, S.P.; Dos Santos, P.C. Fe–S Cluster Biogenesis in Gram-Positive Bacteria: SufU Is a Zinc-Dependent Sulfur Transfer Protein. *Biochemistry* **2014**, *53*, 152–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Adinolfi, S.; Iannuzzi, C.; Prischi, F.; Pastore, C.; Iametti, S.; Martin, S.R.; Bonomi, F.; Pastore, A. Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 390–396. [[CrossRef](#)]
161. Nuth, M.; Cowan, J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis: Characterization of IscU-IscS complex formation and a structural model for sulfide delivery to the [2Fe–2S] assembly site. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 829–839. [[CrossRef](#)]
162. Tsai, C.L.; Barondeau, D.P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe–S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9132–9139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Bridwell-Rabb, J.; Iannuzzi, C.; Pastore, A.; Barondeau, D.P. Effector role reversal during evolution: The case of frataxin in Fe–S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2506–2514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Colin, F.; Martelli, A.; Clemancey, M.; Latour, J.M.; Gambarelli, S.; Zepieri, L.; Birck, C.; Page, A.; Puccio, H.; Ollagnier de Choudens, S. Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe₄S₄ cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 733–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Unciuleac, M.C.; Chandramouli, K.; Naik, S.; Mayer, S.; Huynh, B.H.; Johnson, M.K.; Dean, D.R. In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe–4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe–S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6812–6821. [[CrossRef](#)]
166. Iannuzzi, C.; Adinolfi, S.; Howes, B.D.; Garcia-Serres, R.; Clemancey, M.; Latour, J.M.; Smulevich, G.; Pastore, A. The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the *E. coli* IscU scaffold protein. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21992. [[CrossRef](#)]
167. Fox, N.G.; Chakrabarti, M.; McCormick, S.P.; Lindahl, P.A.; Barondeau, D.P. The Human Iron-Sulfur Assembly Complex Catalyzes the Synthesis of [2Fe–2S] Clusters on ISCU2 That Can Be Transferred to Acceptor Molecules. *Biochemistry* **2015**, *54*, 3871–3879. [[CrossRef](#)]
168. Tokumoto, U.; Takahashi, Y. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem.* **2001**, *130*, 63–71. [[CrossRef](#)]

169. Lange, H.; Kaut, A.; Kispal, G.; Lill, R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1050–1055. [[CrossRef](#)]
170. Djaman, O.; Outten, F.W.; Imlay, J.A. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44590–44599. [[CrossRef](#)]
171. Muhlenhoff, U.; Gerber, J.; Richhardt, N.; Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4815–4825. [[CrossRef](#)]
172. Sheftel, A.D.; Stehling, O.; Pierik, A.J.; Elsasser, H.P.; Muhlenhoff, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11775–11780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Shi, Y.; Ghosh, M.; Kovtunovych, G.; Crooks, D.R.; Rouault, T.A. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 484–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Li, J.; Saxena, S.; Pain, D.; Dancis, A. Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1503–1509. [[CrossRef](#)]
175. Wan, J.T.; Jarrett, J.T. Electron acceptor specificity of ferredoxin (flavodoxin): NADP⁺ oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *406*, 116–126. [[CrossRef](#)]
176. Yan, R.; Adinolfi, S.; Pastore, A. Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron-sulfur cluster assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1854*, 1113–1117. [[CrossRef](#)]
177. Cai, K.; Tonelli, M.; Frederick, R.O.; Markley, J.L. Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Biochemistry* **2017**, *56*, 487–499. [[CrossRef](#)]
178. Kim, J.H.; Frederick, R.O.; Reinen, N.M.; Troupis, A.T.; Markley, J.L. [2Fe–2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8117–8120. [[CrossRef](#)]
179. Yan, R.; Konarev, P.V.; Iannuzzi, C.; Adinolfi, S.; Roche, B.; Kelly, G.; Simon, L.; Martin, S.R.; Py, B.; Barras, F.; et al. Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 24777–24787. [[CrossRef](#)]
180. Galardon, E.; Roger, T.; Deschamps, P.; Roussel, P.; Tomas, A.; Artaud, I. Synthesis of a Fe(II)SH complex stabilized by an intramolecular N–H...S hydrogen bond, which acts as a H₂S donor. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10068–10070. [[CrossRef](#)]
181. Tsou, C.C.; Chiu, W.C.; Ke, C.H.; Tsai, J.C.; Wang, Y.M.; Chiang, M.H.; Liaw, W.F. Iron(III) bound by hydrosulfide anion ligands: NO-promoted stabilization of the [Fe(III)–SH] motif. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9424–9433. [[CrossRef](#)]
182. Dey, A.; Hocking, R.K.; Larsen, P.; Borovik, A.S.; Hodgson, K.O.; Hedman, B.; Solomon, E.I. X-ray absorption spectroscopy and density functional theory studies of [(H₃buea)Fe^{III}–X]^{n–} (X = S^{2–}, O^{2–}, OH[–]): Comparison of bonding and hydrogen bonding in oxo and sulfido complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9825–9833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Conradie, J.; Tangen, E.; Ghosh, A. Trigonal bipyramidal iron(III) and manganese(III) oxo, sulfido, and selenido complexes. An electronic-structural overview. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 707–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Larsen, P.L.; Gupta, R.; Powell, D.R.; Borovik, A.S. Chalcogens as terminal ligands to iron: Synthesis and structure of complexes with Fe(III)–S and Fe(III)–Se motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6522–6523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Li, H.; Outten, C.E. Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe–2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4377–4389. [[CrossRef](#)]
186. Rouhier, N.; Couturier, J.; Johnson, M.K.; Jacquot, J.P. Glutaredoxins: Roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 43–52. [[CrossRef](#)]
187. Banci, L.; Brancaccio, D.; Ciofi-Baffoni, S.; Del Conte, R.; Gadepalli, R.; Mikolajczyk, M.; Neri, S.; Piccioli, M.; Winkelman, J. [2Fe–2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6203–6208. [[CrossRef](#)]

188. Shakamuri, P.; Zhang, B.; Johnson, M.K. Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe₂S₂] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15213–15216. [[CrossRef](#)]
189. Agar, J.N.; Zheng, L.; Cash, V.L.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Role of the IscU Protein in Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis: IscS-mediated Assembly of a [Fe₂S₂] Cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2136–2137. [[CrossRef](#)]
190. Wu, G.; Mansy, S.S.; Wu Sp, S.P.; Surerus, K.K.; Foster, M.W.; Cowan, J.A. Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5024–5032. [[CrossRef](#)]
191. Tsai, C.L.; Bridwell-Rabb, J.; Barondeau, D.P. Friedreich's ataxia variants I154F and W155R diminish frataxin-based activation of the iron-sulfur cluster assembly complex. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6478–6487. [[CrossRef](#)]
192. Bridwell-Rabb, J.; Winn, A.M.; Barondeau, D.P. Structure-function analysis of Friedreich's ataxia mutants reveals determinants of frataxin binding and activation of the Fe–S assembly complex. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7265–7274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Fox, N.G.; Das, D.; Chakrabarti, M.; Lindahl, P.A.; Barondeau, D.P. Frataxin Accelerates [2Fe–2S] Cluster Formation on the Human Fe–S Assembly Complex. *Biochemistry* **2015**, *54*, 3880–3889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Pandey, A.; Gordon, D.M.; Pain, J.; Stemmler, T.L.; Dancis, A.; Pain, D. Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe–S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36773–36786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Behshad, E.; Parkin, S.E.; Bollinger, J.M., Jr. Mechanism of cysteine desulfurase Slr0387 from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Kinetic analysis of cleavage of the persulfide intermediate by chemical reductants. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12220–12226. [[CrossRef](#)]
196. Lacourciere, G.M.; Stadtman, T.C. The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30921–30926. [[CrossRef](#)]
197. Zheng, L.; White, R.H.; Cash, V.L.; Dean, D.R. Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4714–4720. [[CrossRef](#)]
198. Ponsoero, A.J.; Igbaria, A.; Darch, M.A.; Miled, S.; Outten, C.E.; Winther, J.R.; Palais, G.; D'Autreaux, B.; Delaunay-Moisan, A.; Toledano, M.B. Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 962–973 e965. [[CrossRef](#)]
199. Furne, J.; Saeed, A.; Levitt, M.D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R1479–R1485. [[CrossRef](#)]
200. Ross-Inta, C.; Tsai, C.Y.; Giulivi, C. The mitochondrial pool of free amino acids reflects the composition of mitochondrial DNA-encoded proteins: Indication of a post-translational quality control for protein synthesis. *Biosci. Rep.* **2008**, *28*, 239–249. [[CrossRef](#)]
201. Agar, J.N.; Yuvaniyama, P.; Jack, R.F.; Cash, V.L.; Smith, A.D.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 167–177. [[CrossRef](#)]
202. Yuvaniyama, P.; Agar, J.N.; Cash, V.L.; Johnson, M.K.; Dean, D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe–2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 599–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Chandramouli, K.; Unciuleac, M.C.; Naik, S.; Dean, D.R.; Huynh, B.H.; Johnson, M.K. Formation and properties of [4Fe–4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6804–6811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Outten, F.W. Recent advances in the Suf Fe–S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1464–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Wollers, S.; Layer, G.; Garcia-Serres, R.; Signor, L.; Clemancey, M.; Latour, J.M.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. Iron–sulfur (Fe–S) cluster assembly: The SufBC₂D complex is a new type of Fe–S scaffold with a flavin redox cofactor. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23331–23341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Hirabayashi, K.; Yuda, E.; Tanaka, N.; Katayama, S.; Iwasaki, K.; Matsumoto, T.; Kurisu, G.; Outten, F.W.; Fukuyama, K.; Takahashi, Y.; et al. Functional Dynamics Revealed by the Structure of the SufBC₂D Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 29717–29731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

207. Riboldi, G.P.; Verli, H.; Frazzon, J. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein. *BMC Biochem.* **2009**, *10*, 3. [[CrossRef](#)]
208. Selbach, B.; Earles, E.; Dos Santos, P.C. Kinetic analysis of the bisubstrate cysteine desulfurase SufS from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8794–8802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Albrecht, A.G.; Netz, D.J.; Miethke, M.; Pierik, A.J.; Burghaus, O.; Peuckert, F.; Lill, R.; Marahiel, M.A. SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1643–1651. [[CrossRef](#)]
210. Yokoyama, N.; Nonaka, C.; Ohashi, Y.; Shioda, M.; Terahata, T.; Chen, W.; Sakamoto, K.; Maruyama, C.; Saito, T.; Yuda, E.; et al. Distinct roles for U-type proteins in iron-sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the *Bacillus subtilis* sufCDSUB operon. *Mol. Microbiol.* **2018**, *107*, 688–703. [[CrossRef](#)]
211. Saini, A.; Mapolelo, D.T.; Chahal, H.K.; Johnson, M.K.; Outten, F.W. SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe–S cluster formation on SufB. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9402–9412. [[CrossRef](#)]
212. Nachin, L.; Loiseau, L.; Expert, D.; Barras, F. SufC: An unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **2003**, *22*, 427–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Tirupati, B.; Vey, J.L.; Drennan, C.L.; Bollinger, J.M., Jr. Kinetic and structural characterization of Slr0077/SufS, the essential cysteine desulfurase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12210–12219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Outten, F.W.; Wood, M.J.; Munoz, F.M.; Storz, G. The SufE protein and the SufBC₂D complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe–S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45713–45719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Zafrilla, B.; Martinez-Espinosa, R.M.; Esclapez, J.; Perez-Pomares, F.; Bonete, M.J. SufS protein from *Haloferax volcanii* involved in Fe–S cluster assembly in haloarchaea. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 1476–1482. [[CrossRef](#)]
216. Ollagnier-de-Choudens, S.; Lascoux, D.; Loiseau, L.; Barras, F.; Forest, E.; Fontecave, M. Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: Evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 263–267. [[CrossRef](#)]
217. Singh, H.; Dai, Y.; Outten, F.W.; Busenlehner, L.S. *Escherichia coli* SufE sulfur transfer protein modulates the SufS cysteine desulfurase through allosteric conformational dynamics. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36189–36200. [[CrossRef](#)]
218. Dai, Y.; Kim, D.; Dong, G.; Busenlehner, L.S.; Frantom, P.A.; Outten, F.W. SufE D74R Substitution Alters Active Site Loop Dynamics To Further Enhance SufE Interaction with the SufS Cysteine Desulfurase. *Biochemistry* **2015**, *54*, 4824–4833. [[CrossRef](#)]
219. Kim, D.; Singh, H.; Dai, Y.; Dong, G.; Busenlehner, L.S.; Outten, F.W.; Frantom, P.A. Changes in Protein Dynamics in *Escherichia coli* SufS Reveal a Possible Conserved Regulatory Mechanism in Type II Cysteine Desulfurase Systems. *Biochemistry* **2018**, *57*, 5210–5217. [[CrossRef](#)]
220. Dunkle, J.A.; Bruno, M.R.; Outten, F.W.; Frantom, P.A. Structural Evidence for Dimer-Interface-Driven Regulation of the Type II Cysteine Desulfurase, SufS. *Biochemistry* **2019**, *58*, 687–696. [[CrossRef](#)]
221. Blahut, M.; Wise, C.E.; Bruno, M.R.; Dong, G.; Makris, T.M.; Frantom, P.A.; Dunkle, J.A.; Outten, F.W. Direct observation of intermediates in the SufS cysteine desulfurase reaction reveals functional roles of conserved active-site residues. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 12444–12458. [[CrossRef](#)]
222. Kim, S.; Park, S. Structural changes during cysteine desulfurase CsdA and sulfur acceptor CsdE interactions provide insight into the trans-persulfuration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27172–27180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Dunkle, J.A.; Bruno, M.R.; Frantom, P.A. Structural evidence for a latch mechanism regulating access to the active site of SufS-family cysteine desulfurases. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **2020**, *76*, 291–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Fernández, F.J.; Ardá, A.; López-Esteva, M.; Aranda, J.; Peña-Soler, E.; Garces, F.; Round, A.; Campos-Olivas, R.; Bruix, M.; Coll, M.; et al. Mechanism of Sulfur Transfer Across Protein–Protein Interfaces: The Cysteine Desulfurase Model System. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3975–3984. [[CrossRef](#)]
225. Goldsmith-Fischman, S.; Kuzin, A.; Edstrom, W.C.; Benach, J.; Shastry, R.; Xiao, R.; Acton, T.B.; Honig, B.; Montelione, G.T.; Hunt, J.F. The SufE sulfur-acceptor protein contains a conserved core structure that mediates interdomain interactions in a variety of redox protein complexes. *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 549–565. [[CrossRef](#)]

226. Liu, G.; Li, Z.; Chiang, Y.; Acton, T.; Montelione, G.T.; Murray, D.; Szyperski, T. High-quality homology models derived from NMR and X-ray structures of *E. coli* proteins YgdK and Suf E suggest that all members of the YgdK/Suf E protein family are enhancers of cysteine desulfurases. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1597–1608. [[CrossRef](#)]
227. Selbach, B.P.; Pradhan, P.K.; Dos Santos, P.C. Protected sulfur transfer reactions by the *Escherichia coli* Suf system. *Biochemistry* **2013**, *52*, 4089–4096. [[CrossRef](#)]
228. Riboldi, G.P.; de Oliveira, J.S.; Frazzon, J. Enterococcus faecalis SufU scaffold protein enhances SufS desulfurase activity by acquiring sulfur from its cysteine-153. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 1910–1918. [[CrossRef](#)]
229. Albrecht, A.G.; Peuckert, F.; Landmann, H.; Miethke, M.; Seubert, A.; Marahiel, M.A. Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron-sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 465–470. [[CrossRef](#)]
230. Kornhaber, G.J.; Snyder, D.; Moseley, H.N.; Montelione, G.T. Identification of zinc-ligated cysteine residues based on ¹³C α and ¹³C β chemical shift data. *J. Biomol. NMR* **2006**, *34*, 259–269. [[CrossRef](#)]
231. Liu, J.; Oganessian, N.; Shin, D.H.; Jancarik, J.; Yokota, H.; Kim, R.; Kim, S.H. Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form. *Proteins* **2005**, *59*, 875–881. [[CrossRef](#)]
232. Fujishiro, T.; Terahata, T.; Kunichika, K.; Yokoyama, N.; Maruyama, C.; Asai, K.; Takahashi, Y. Zinc-Ligand Swapping Mediated Complex Formation and Sulfur Transfer between SufS and SufU for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18464–18467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Blauenburg, B.; Mielcarek, A.; Altegoer, F.; Fage, C.D.; Linne, U.; Bange, G.; Marahiel, M.A. Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Cysteine Desulfurase SufS and Its Dynamic Interaction with Frataxin and Scaffold Protein SufU. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Yuda, E.; Tanaka, N.; Fujishiro, T.; Yokoyama, N.; Hirabayashi, K.; Fukuyama, K.; Wada, K.; Takahashi, Y. Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).