



**HAL**  
open science

# Mobilisation et incorporation enzymatique du soufre lors de réactions non-redox impliquant un centre [4Fe-4S] : étude biochimique et structurale d'une cystéine désulfidase et d'une sulfurtransférase

Paolo Zecchin

► **To cite this version:**

Paolo Zecchin. Mobilisation et incorporation enzymatique du soufre lors de réactions non-redox impliquant un centre [4Fe-4S] : étude biochimique et structurale d'une cystéine désulfidase et d'une sulfurtransférase. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS667 . tel-04621627

**HAL Id: tel-04621627**

**<https://theses.hal.science/tel-04621627>**

Submitted on 24 Jun 2024

**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.

Ecole doctorale Complexité du vivant (515) – Sorbonne Université  
*Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques - Collège de France*

**Mobilisation et incorporation enzymatique du soufre lors de  
réactions non-redox impliquant un centre [4Fe-4S] : Etude  
biochimique et structurale d'une cystéine désulfidase et d'une  
sulfurtransférase**

Par Paolo Zecchin

Thèse de Doctorat en Biochimie et biologie structurale

Dirigée par Dr. Béatrice Golinelli-Pimpaneau

Présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2023 devant un jury composé de :

Président du jury : Catherine Vénien-Bryan  
Professeure à Sorbonne Université

Rapporteurs : Sandrine Boschi-Muller  
Professeure à l'Université de Lorraine

Yvain Nicolet  
Directeur de recherche au Commissariat à l'énergie atomique (CEA)

Examineurs : Benoît D'autréaux  
Directeur de recherche à l'INSERM

Julien Henri  
Directeur de recherche à Sorbonne Université

Invité : Marc Fontecave  
Professeur au Collège de France





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, Béatrice Golinelli, ainsi qu'à Marc Fontecave, directeur du laboratoire, qui m'ont accueilli en tant que doctorant et m'ont offert des conditions idéales pour mener à bien mes trois années de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Jingjing pour son aide et son soutien dès mon arrivée au laboratoire. Nos échanges passionnants ont grandement enrichi mon expérience, et je suis heureux que notre amitié se soit poursuivie après son départ. Mes remerciements vont également à Bruno Faivre et Ludovic Pecqueur pour leur aide et leurs conseils avisés en biochimie et cristallographie, ainsi que pour m'avoir initié au système d'exploitation UNIX.

Je suis très reconnaissant envers tous les membres de mon jury de thèse : le Pr. Sandrine Boschi-Muller et le Dr. Yvain Nicolet en tant que rapporteurs, et le Pr. Catherine Vénien-Bryan, Dr. Benoît D'autréaux et Dr. Julien Henri en tant qu'examineurs. Je suis également reconnaissant au Dr. Frédéric Devaux et au Dr. Ali Ladram pour leur participation à mes comités de suivi de thèse.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, en particulier à Johnny, Jessica, Marouane, Sylvain, Charles, Adèle, Guillermo, Hamid, Youven, Florian, Alessandro et Benjamin, pour les moments agréables et enrichissants partagés ensemble. Je suis particulièrement reconnaissant envers Iulia et Raphael, avec qui la rencontre au laboratoire s'est transformée en une amitié solaire.

Je suis infiniment reconnaissant envers ma mère pour son soutien inconditionnel, surtout durant ma convalescence en milieu de thèse. Ma gratitude va aussi à ma sœur Maïa, à ma nonna, à mon père, et à toute ma famille pour leur appui. Je remercie chaleureusement l'ensemble de mes amis, et particulièrement Morel, Lucas, Momo, Chloé et Giovanni, pour les beaux moments partagés durant cette période. Je suis reconnaissant à Mathieu pour son aide lorsque j'ai eu ma fracture à la jambe. Un remerciement tout particulier à ma copine Cécile pour son affection et son soutien. Je suis également reconnaissant envers Juliette pour m'avoir encouragé à entreprendre cette aventure et pour avoir été présente à mes côtés au début de ce parcours.

Enfin, je remercie les nombreux artistes, tels que Pink Floyd, Mike Oldfield, Philip Glass, Frank Zappa, Glenn Gould, Charles Mingus, Massive Attack, Fela Kuti, et bien d'autres, dont la musique m'a accompagné tout au long de ces trois années.

# Sommaire

Remerciements .....	i
Sommaire.....	iii
<b>Introduction Bibliographique .....</b>	<b>1</b>
I. Utilisation du soufre en biologie .....	2
I.1. L'élément soufre .....	2
I.2. Métabolisme général du soufre.....	4
I.3. Biosynthèse et utilisation des molécules soufrées .....	6
II. Les clusters [Fe-S], un cofacteur inorganique .....	12
II.1. La chimie bio-inorganique.....	12
II.2. Distribution des clusters [Fe-S] et importance physiologique.....	14
II.3. Biogenèse des clusters [Fe-S].....	14
II.4. Diversité des clusters [Fe-S].....	18
II.5. Diversité d'utilisation des clusters [Fe-S] en biologie.....	20
III. Mécanismes enzymatiques de mobilisation du soufre en biologie .....	26
III.1. Mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation de persulfures .....	26
III.2. Une mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation d'un cluster [4Fe-4S] ?	36
IV. Mécanismes enzymatiques d'insertion du soufre dans les biomolécules.....	38
IV.1. Insertion du soufre impliquant l'utilisation d'intermédiaires persulfures par des enzymes de la superfamille des rhodanèses .....	40
IV.2. Insertion enzymatique du soufre impliquant un intermédiaire thiocarboxylate.....	42
IV.3. Insertion enzymatique du soufre impliquant l'utilisation d'un cofacteur [Fe-S] ...	44
IV.4. Insertion enzymatique du soufre impliquant un résidu sacrificiel .....	48
<b>Projet 1 : La cystéine désulfidase CyuA de <i>M. maripaludis</i>, une mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation d'un cluster [Fe-S] ?.....</b>	<b>50</b>
I. Genèse du projet.....	52
II. Problématique du projet .....	60
III. Déroulement du projet.....	62
IV. Discussion .....	73
IV.1. De la caractérisation biochimique et structurale de la cystéine désulfidase .....	73
IV.2. De la caractérisation fonctionnelle de la cystéine désulfidase .....	79
V. Article 1 .....	88
<b>Projet 2 : La sulfure transférase LarE de <i>M. maripaludis</i>, de l'enzyme suicide à l'enzyme catalytique ? .....</b>	<b>135</b>
I. Genèse du projet.....	136
II. Problématique du projet .....	144
III. Déroulement du projet.....	148
IV. Discussion .....	158
V. Article 2.....	164
<b>Projet 3 : Détermination de la masse molaire des protéines liant un centre [Fe-S] par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière multi-angles (SEC-MALS).....</b>	<b>201</b>
I. Genèse du projet/Déroulement/Contribution .....	202
Discussion .....	202
II. Article 3.....	204
Conclusion générale .....	216
Bibliographie.....	219



## **Introduction Bibliographique**

Cette thèse porte sur l'étude de deux enzymes impliquées dans le métabolisme du soufre et qui dépendent toutes deux d'un centre [4Fe-4S] : MmCyuA, une L-cystéine désulfidase, et MmLarE, une sulfurtransférase dépendante de l'ATP. L'introduction met en évidence l'importance du soufre en biologie et explore les voies métaboliques associées. Elle aborde également les caractéristiques et la diversité d'utilisation des centres [Fe-S] par les métalloenzymes. Enfin, considérant que MmCyuA et MmLarE catalysent deux types de réactions distinctes dans la manipulation du soufre - respectivement la désulfuration ou l'incorporation de soufre dans des biomolécules - les dernières parties de l'introduction visent à présenter la variété des mécanismes enzymatiques impliqués dans ces processus. L'objectif est de positionner les deux enzymes étudiées dans un contexte plus large, afin de comprendre les enjeux et les implications de leur étude dans le cadre de cette thèse.

# I. Utilisation du soufre en biologie

## I.1. L'élément soufre

L'élément soufre est un composant essentiel à la vie. Il est considéré comme aussi important que le carbone et l'azote dans de nombreux scénarios récents décrivant l'origine de la vie [Han, 2022]. La concentration moyenne de soufre à la surface de la Terre est estimée à environ 520 ppm, avec des variations allant de 270 à 2400 ppm dans les roches et entre 3,7 et 905 ppm dans l'eau douce et l'eau de mer, respectivement [Ehrlich, 1998 ; Sekowska, 2000]. En conditions anaérobies, le soufre se présente sous une forme réduite, souvent associée à des métaux comme dans la pyrite des roches [Payne, 2021]. Le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), la forme oxydée et stable du soufre inorganique, est largement répandu dans des environnements variés tels que le sol et l'océan [Kawano, 2017]. D'autres états d'oxydation intermédiaires du soufre existent également, incluant le sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) et le thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) [Sekowska, 2000] (**Figure 1**).

Sur Terre, le soufre participe à un cycle biogéochimique, à l'image d'autres éléments tels que le carbone, l'azote et le phosphore (**Figure 2**). Ce cycle est alimenté par la capacité des microorganismes et des plantes à transformer les sources inorganiques de soufre, comme le sulfate et le thiosulfate, en acides aminés tels que la cystéine et la méthionine. Ce processus passe par une série de réactions enzymatiques qui convertissent le sulfate en intermédiaires comme le sulfite et le sulfure ( $\text{S}^{2-}$ ) (cf. section I.2.2) [Kawano, 2018] (**Figure 3**). Bien que la concentration de soufre dans les organismes vivants soit relativement faible, il représente le septième minéral en termes d'abondance dans le corps humain [Sekowska, 2000 ; Kawano, 2018 ; Ingenbleek, 2013].

L'importance du soufre en biologie a été mise en évidence il y a plus d'un siècle avec la découverte de nombreuses biomolécules soufrées jouant un rôle dans diverses voies métaboliques essentielles [Beinert, 2000 ; Kessler, 2006 ; Black & Dos Santos, 2015]. Ces molécules comprennent notamment des cofacteurs, tels que la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) ou les clusters [Fe-S], des antioxydants comme le glutathion, mais aussi des macromolécules comme les ARNt contenant des nucléosides thiolés ou les protéines contenant les acides aminés cystéine ou méthionine. Certaines de ces molécules seront détaillées par la suite. Étant donné l'importance du soufre en biologie, comprendre son métabolisme est essentiel pour une meilleure appréhension du vivant.

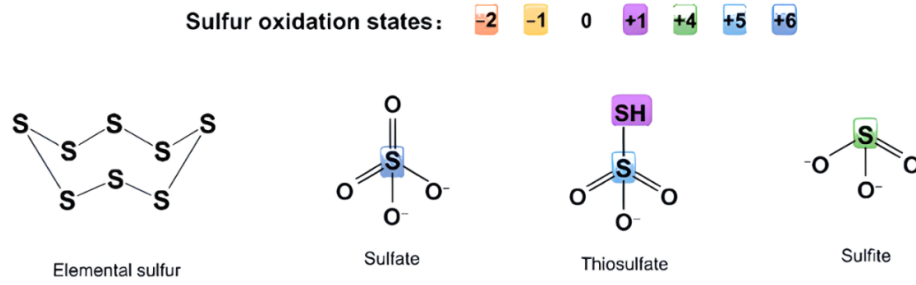


Figure 1: Les différentes formes de soufre inorganique et le nombre d'oxydation du soufre qui leur est associé. Adapté de [Han 2022]

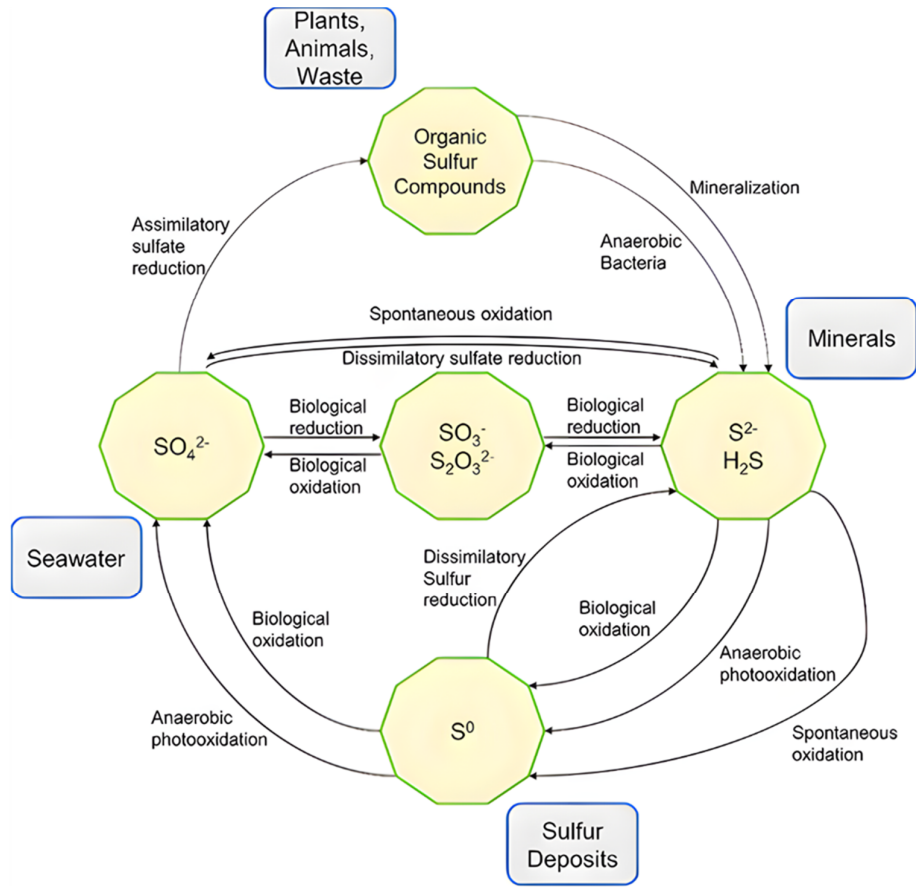


Figure 2 : Cycle du soufre simplifié [McNeice 2022].



## I.2. Métabolisme général du soufre

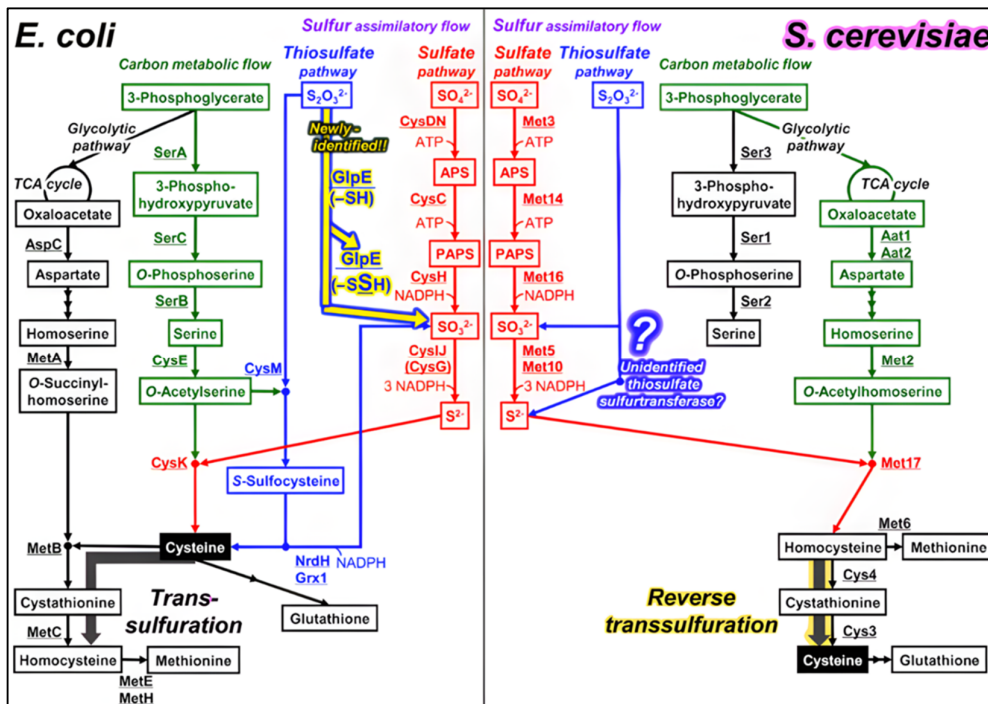
Le métabolisme du soufre peut être départagé en deux voies principales : l'assimilation de soufre inorganique issu de l'environnement, conduisant à la synthèse de molécules organiques comme la cystéine et la méthionine (**Figure 3**), et sa réutilisation ultérieure dans diverses voies biosynthétiques pour la production de composés soufrés.

### I.2.1. Assimilation du soufre chez les procaryotes

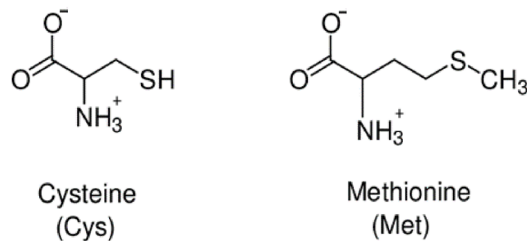
L'assimilation biologique du soufre inorganique débute par son incorporation dans les acides aminés cystéine et méthionine [Francioso, 2020] (**Figure 3**). Les microorganismes et les plantes produisent ces acides aminés principalement à partir de sources inorganiques de soufre, notamment le sulfate et le thiosulfate. Ce processus d'assimilation, en particulier par la voie de la biosynthèse de la cystéine, constitue un maillon essentiel du cycle du soufre terrestre [Kawano, 2018]. La cystéine et la méthionine, indispensables à la synthèse des protéines, se distinguent par la nature de leur groupe fonctionnel soufré : un groupe thiol SH pour la cystéine et un groupe thioéther S-CH<sub>3</sub> pour la méthionine (**Figure 4**). Pour entamer la biosynthèse de novo de la cystéine chez divers microorganismes, le sulfate est d'abord converti en sulfure à travers plusieurs réactions enzymatiques. Initialement, il est incorporé dans l'adénosine phosphosulfate (APS), un intermédiaire qui facilite l'intégration du soufre inorganique dans le métabolisme [Schmidt, 1974 ; Francioso, 2020], [Kessler, 2006]. Puis, chez *E. coli*, ce sulfure est conjugué avec l'O-acétyl-L-sérine pour former de la cystéine.

Dans de nombreux organismes, la biosynthèse de la méthionine est étroitement liée à celle de la cystéine par le biais de différentes voies métaboliques. Chez *E. coli*, la méthionine est formée à partir de la cystéine via la voie de transsulfuration [Kawano, 2017] (**Figure 3**). La combinaison de l'O-succinylhomosérine, un dérivé réactif de l'homosérine, avec la cystéine conduit à la production de cystathionine. L'enzyme S-lyase convertit ensuite la cystathionine en sérine et homocystéine, composé à partir duquel est formée la méthionine par S-méthylation [Kung, 1972 ; Sekowska, 2000] (**Figure 3**).

Les thiosulfates, peuvent également constituer des sources de soufre alternatives pour certains microorganismes [Cook, 1999] (**Figure 3**). Une fois dans la cellule, ces molécules libèrent leur soufre sous forme de sulfate ou sulfure, s'intégrant ensuite à la voie biosynthétique de la cystéine [Sekowska, 2000 ; Kawano, 2018] (**Figure 3**).



**Figure 3 : Processus d'assimilation progressive par réduction du soufre inorganique (Thiosulfate et Sulfate) chez deux microorganismes (*E.coli* et *S.cerevisiae*) passant les intermédiaires sulfite et sulfure avant de conduire à la synthèse d'acides aminés soufrés.**  
D'après [Kawano, 2018]



**Figure 4 : Structure de la cystéine et de la méthionine [Karunakaran, 2010].**

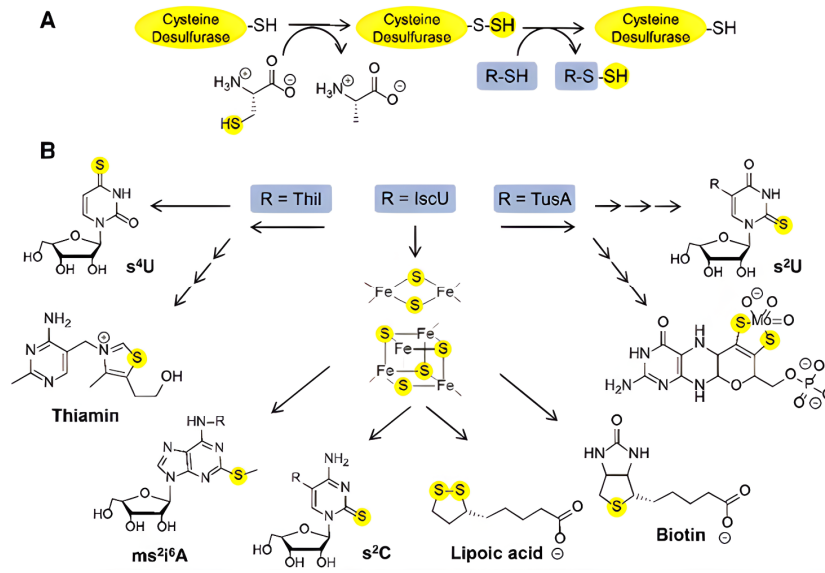
### **I.2.2. Assimilation du soufre chez les eucaryotes**

Chez *S. cerevisiae*, un organisme modèle eucaryote, la voie d'assimilation du sulfate ressemble à celle des procaryotes jusqu'à la production de sulfure (**Figure 3**). Ensuite, les étapes divergent, se focalisant principalement sur la formation de l'homocystéine. Ce métabolite clé sert de jonction critique dans le métabolisme du soufre, ouvrant la voie soit vers la synthèse de la méthionine, soit vers la production de la cystéine et d'autres métabolites à travers la voie de transsulfuration [Kredich, 2008 ; Kabil, 2014 ; Marzluf, 1997].

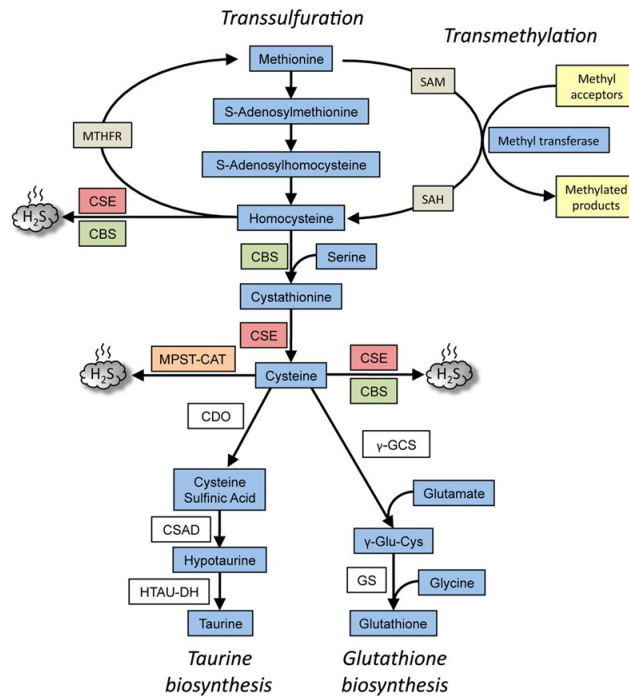
En revanche, les mammifères présentent un métabolisme du soufre unique dont la voie d'assimilation du soufre se distingue de celles des organismes présentés précédemment. Chez ces organismes, l'incapacité à synthétiser la méthionine de novo rend cet acide aminé essentiel [Francioso, 2020]. Les mammifères, y compris l'homme, dépendent donc de l'apport alimentaire en méthionine pour la biosynthèse de cystéine et celle de diverses biomolécules soufrées qui en dépendent [Kawano, 2018]. Ainsi, de par leur métabolisme primaire produisant de la méthionine [Francioso, 2020], les plantes constituent une source vitale de soufre pour les mammifères.

### **I.3. Biosynthèse et utilisation des molécules soufrées**

Pour la synthèse des biomolécules soufrées, les organismes vivants ont mis en place des mécanismes de transfert du soufre de la cystéine vers divers thio-cofacteurs (**Figure 5**). Ce système de transfert complexe, assuré par de multiples composants protéiques, permet un contrôle de la direction du flux de soufre dans la cellule. La cystéine désulfurase permet la mobilisation initiale du soufre à partir de la cystéine vers différents accepteurs de soufre, via la formation d'un intermédiaire persulfure sur une cystéine catalytique (Cf. section III.) (**Figure 5**) [Black 2015]. La régulation de la mobilisation du soufre est cruciale pour empêcher une accumulation excessive de sulfure libre ( $S^{2-}$ ), pouvant interférer avec les processus cellulaires ou bien entraîner la formation de polysulfures toxiques pour la cellule [Kessler, 2006 ; Paulsen, 2013 ; Das, 2021]. Chez les bactéries, la synthèse de novo de biomolécules contenant du soufre englobe des structures complexes telles que les clusters [Fe-S], la thiamine, la biotine, l'acide lipoïque, le cofacteur de molybdène (Moco), et les nucléosides thiolés présents dans les ARNt [Black, 2015].



**Figure 5 :** (A) Réaction de desulfuration de la L-cystéine libre catalysée par la cystéine désulfurase, résultant en la formation d'un persulfure lié à l'enzyme (-S-SH). (B) Ce persulfure peut ensuite être transféré à divers accepteurs de soufre (R-S-SH), permettant l'incorporation du soufre dans une variété de molécules sulfurées utilisées par la cellule [Black 2015].



**Figure 6 :** Illustration de la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S, en gris) dans la voie de transsulfuration [Sbodio, 2019]. Les enzymes clés sont identifiées : CSE pour la cystathionine gamma-lyase, CBS pour la cystathionine bêta-synthase, et MPST-CAT pour la 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.

En revanche, les eucaryotes ne peuvent synthétiser de novo que quelques-uns de ces composés, à savoir les clusters [Fe-S], le Moco et les thionucléosides [Leimkuehler, 2017 ; Francioso, 2020 ; Hidese, 2011]. Le rôle de certains de ces métabolites soufrés, comme par exemple les lanthionines et les kétimines cycliques, ainsi que les mécanismes régissant l'incorporation du soufre dans les molécules précurseurs, demeurent encore inconnus [Hensley, 2010 ; Hensley, 2015 ; Weber, 1982 ; Francioso, 2020].

Les molécules soufrées succinctement décrites ci-après sont associées à des enzymes qui feront l'objet d'une description détaillée dans les sections III et IV de cette introduction.

### **I.3.1. Le sulfure d'hydrogène**

Le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) est produit enzymatiquement à partir de métabolites soufrés tels que la cystéine, la cystathionine, l'homocystéine et le 3-mercaptopyrivate [Shodio, 2019 ; Alsohaibani, 2023]. Les enzymes impliquées dans sa production comprennent la cystathionine bêta-synthase, la cystathionine gamma-lyase [Singh, 2009 ; Kabil, 2014] ainsi que la 3-mercaptopyrivate sulfurtransférase (voir section III.) [Lec, 2018 ; Shibuya, 2009 ; Kabil, 2014] (**Figure 7**). Reconnu comme un gazotransmetteur chez les humains, le H<sub>2</sub>S est impliqué dans la régulation de divers processus physiologiques, y compris l'inflammation, l'angiogenèse, la défense contre le stress oxydatif, et possède des effets pro-tumoraux ou anti-tumoraux [Kabil, 2014 ; Das, 2021]. Au niveau cellulaire, le H<sub>2</sub>S contribue à l'équilibre redox en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA). Il modifie également la fonctionnalité des protéines en se liant aux groupes thiol des cystéines, en interagissant avec des centres métalliques et en influençant la respiration mitochondriale [Kabil, 2014 ; Kimura, 2014 ; Pal, 2018 ; Das, 2021].

### **I.3.2. Thio-modifications de l'ARN de transfert**

Les molécules d'ARN de transfert (ARNt) jouent un rôle essentiel dans la synthèse des protéines lors de l'étape de traduction de l'ARN messager en protéine par les ribosomes. L'appariement entre l'anticodon de l'ARNt et le codon de l'ARNm permet l'incorporation spécifique de l'acide aminé lié à l'ARNt dans la chaîne polypeptidique naissante [Berg, 2021]. Les modifications post-transcriptionnelles des ARNt, telles que les thio-modifications, sont déterminantes pour leur fonctionnalité (**Figure 7**) [Forouhar, 2013 ; Mueller, 1998 ; Zheng, 2017 ; Das, 2021 ; Bimai, 2020].

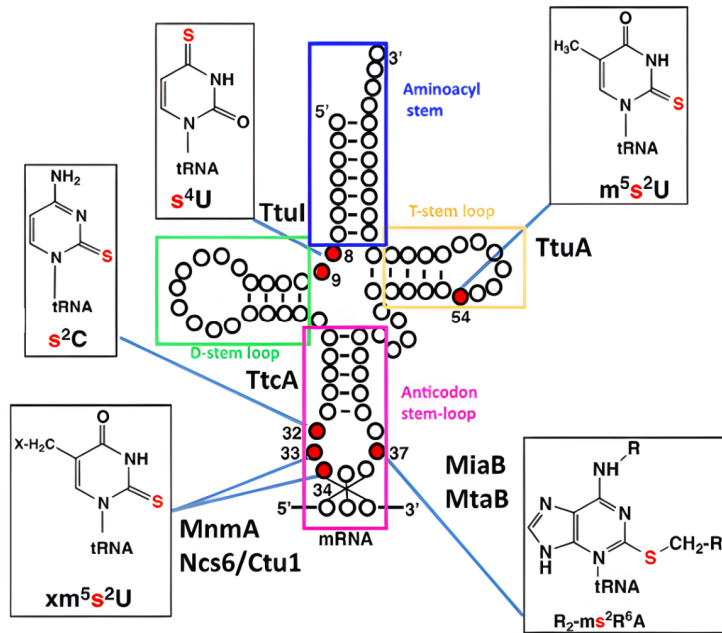


Figure 7 : Les différentes thiolations des ARNt dans les trois règnes du vivant [Bimai, 2021].

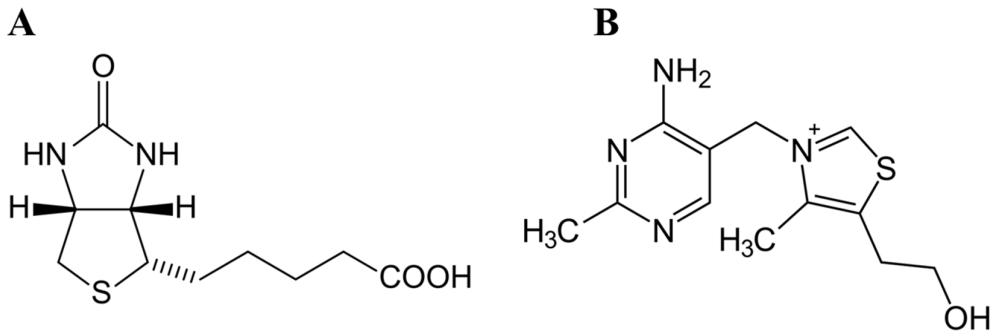


Figure 8 : (A) Structure de la biotine. (B) Structure de la Thiamine

Ces modifications comprennent la 2-thiouridine ( $s^2U$ ), la 4-thiouridine ( $s^4U8$ ), la 2-thiocytidine ( $s^2C32$ ), la 2-méthylthioadénosine ( $ms^2i^6A37$ ) et la 2-thiouridothymidine ( $s^2T54$ ), qui se trouvent à des positions spécifiques de l'ARNt [Zheng, 2017]. Les modifications localisées au niveau de la boucle anticodon (positions 34, 37) sont essentielles pour l'efficacité et la précision de la traduction, tandis que celles présentes dans la boucle T (position 54) augmentent la stabilité de l'ARNt [Zheng, 2017 ; Das, 2021]. Ces réactions de thiolation sont catalysées de manière non redox et sont dépendantes de l'ATP, à l'exception de la méthylthiolation en position 37, qui est une réaction radicalaire dépendante du S-adenosylméthionine (SAM), catalysée par l'enzyme MiaB (Cf. section IV) [Forouhar, 2013].

Plusieurs thiouridines, en particulier en position 8 et 34, sont observées chez les procaryotes. Chez les bactéries, la 4-thiouridine ( $s^4U8$ ) fonctionne comme photosenseur lors d'une exposition à une lumière proche de l'UV et sert de médiateur des réponses cellulaires à ce stress [Mueller, 1998 ; Das, 2021].

La modification de l'U34 ( $cmnm^5s^2U34$ ) dans les ARNt<sup>Lys</sup>, ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup>, présente dans tous les domaines du vivant, est cruciale pour optimiser l'étape de traduction de l'ARNm en protéine [Shigi, 2014 ; Yacoubi, 2012 ; Leimkühler, 2017]. La thiolation de U34 est catalysée par le gène *mnmA* chez les bactéries et dans les mitochondries, et par le gène *ncs6/ctu1/ncsA* chez les archées et dans le cytoplasme des eucaryotes. Chez l'homme, des dysfonctionnements dans la formation de  $mcm^5s^2U$  dans les ARNt cytoplasmiques peuvent être associés à des pathologies graves d'ordre neurologique et respiratoire [Yasukawa, 2001 ; Torres, 2014 ; Ghezzi, 2012 ; Leimkühler, 2017]. L'insertion du soufre dans ces nucléosides par les enzymes de modification de l'ARNt sera décrite dans la section IV de cette introduction.

### I.3.3. La Biotine

La biotine, connue aussi sous le nom de vitamine B7, est une coenzyme cruciale pour le métabolisme énergétique (**Figure 8A**). Elle joue un rôle important dans le métabolisme des acides aminés, la biosynthèse des acides gras et la régénération des intermédiaires du cycle de Krebs [Salaemae, 2016 ; Das, 2021]. En tant que coenzyme, elle est essentielle pour les réactions enzymatiques de carboxylation, décarboxylation et transcarboxylation, intervenant dans les processus catalysés par des enzymes telles que la pyruvate carboxylase et les acyl-CoA carboxylases (ACC) [Cronan, 2018 ; Lotierzo, 2005 ; Salaemae, 2016 ; Das, 2021]. L'insertion

du soufre dans ce composé par la biotine synthase BioB sera décrit dans la section IV de cette introduction.

#### **I.3.4. La Thiamine**

La thiamine, ou vitamine B1, est un cofacteur essentiel avec un hétérocycle soufré (**Figure 8A**). Sa biosynthèse se déroule via deux voies parallèles qui produisent respectivement un dérivé thiazolique et un dérivé pyrimidinique [Lonsdale, 2006]. La combinaison de ces deux produits aboutit à la thiamine pyrophosphate (TPP), utilisée notamment dans le métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée et des glucides [Lonsdale, 2006 ; Polegato, 2019 ; Martinez-Gomez, 2011 ; Das, 2021]. L'insertion du soufre dans ce composé par la biotine synthase BioB sera décrit dans la section IV de cette introduction. L'insertion du soufre dans ce composé par la lipoyl synthase LipA sera décrit dans la section IV de cette introduction.

#### **I.3.5. Les clusters [Fe-S]**

Les clusters [Fe-S] sont des cofacteurs protéiques essentiels qui seront abordés tout au long de cette thèse. Leurs biosynthèses ainsi que leurs caractéristiques sont détaillées dans la section suivante de cette introduction.

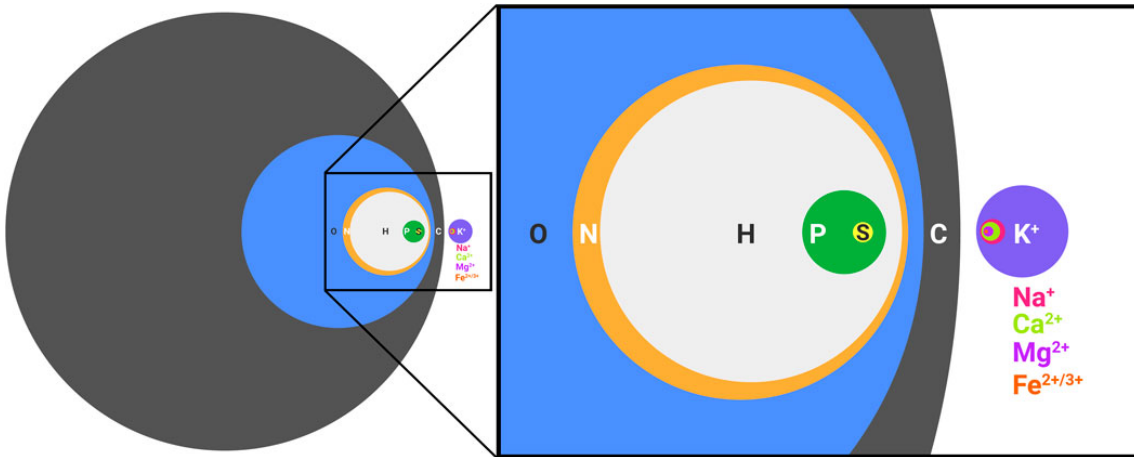


## II. Les clusters [Fe-S], un cofacteur inorganique en biologie

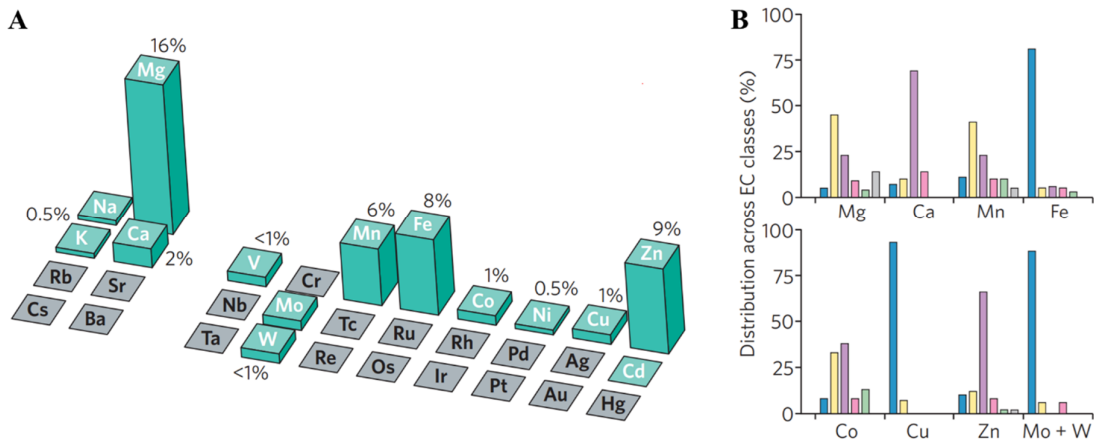
### II.1. La chimie bio-inorganique

La Terre, et plus particulièrement la croûte terrestre, est riche en ions métalliques. Au cours de l'évolution, les organismes se sont adaptés afin de tirer parti de ces ions [Dupont, 2006 ; Andreini, 2020], comme en témoigne l'abondance d'ions métalliques dans la cellule [Rossetto, 2022 ; Williams, 1997]. Des ions tels que  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ainsi que les différentes formes d'oxydation du fer,  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ , sont présents en grande quantité dans la cellule (**Figure 9**) [Waldron, 2009 ; Rossetto, 2022 ; Dupont, 2006 ; Zheng, 2020 ; Williams, 1997].

Ces ions métalliques remplissent de nombreuses fonctions cellulaires, notamment en catalyse enzymatique, où ils peuvent à la fois stabiliser la structure tridimensionnelle des protéines et participer directement à la réaction chimique en interagissant avec le substrat et/ou le produit au sein du site catalytique [Rossetto, 2022 ; Zheng, 2020]. Les enzymes qui intègrent des ions métalliques dans leur activité catalytique sont désignées sous le terme de « métalloenzymes ». Elles sont classifiées en plusieurs catégories selon le type d'ions métalliques qu'elles contiennent et la nature de la réaction qu'elles catalysent [Waldron, 2009 ; Andreini, 2020] (**Figure 10**). L'importance vitale de ces ions implique que tout dysfonctionnement des protéines qui assurent leur transport peut entraîner une perturbation des processus cellulaires, voire être létal pour l'être humain [Umair, 2019 ; Rouault, 2012]. Certaines métalloenzymes contiennent notamment des cofacteurs catalytiques complexes, tels que les clusters [Fe-S].



**Figure 9 : Les ions les plus abondants dans une cellule moyenne bactérienne** [Rossetto, 2022]. Les diamètres sont proportionnels au pourcentage de poids sec.



**Figure 10 : Les ions métalliques impliqués dans le fonctionnement des métalloenzymes et leur distribution selon les classes de métalloenzymes** [Waldron, 2009] : (A) ensemble des ions métalliques essentiels au fonctionnement des métalloenzymes ; (B) nature des ions métalliques associés aux différentes classes d'enzymes, avec les oxydoréductases en bleu, les transférases en jaune, les hydrolases en mauve, les lyases en rose, les isomérases en vert et les ligases en gris.

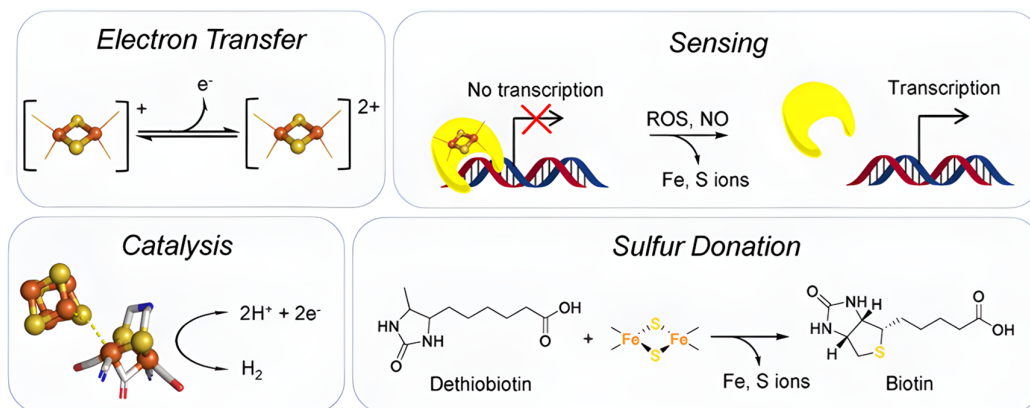
## II.2. Distribution des clusters [Fe-S] et importance physiologique

Identifiés pour la première fois en 1960 par spectroscopie lors de l'étude de la NADH déshydrogénase [Beinert, 1960], les centres fer-soufre (Fe-S) sont des groupements prosthétiques présents dans une large gamme de protéines. Ils jouent un rôle dans de multiples processus cellulaires. À ce jour, au moins 130 protéines dépendant d'un centre [Fe-S] ont été identifiées chez *E. coli*, et environ 200 chez l'homme, avec la découverte continue de nouvelles [Wehrspan, 2022]. Des analyses de séquences génomiques et des prédictions structurales à l'aide d'outils comme AlphaFold permettent aujourd'hui d'identifier d'autres protéines liées aux clusters [Fe-S] [Wehrspan, 2022]. Ces protéines sont remarquablement conservées à travers l'évolution et ubiquitaires parmi les organismes vivants [Andreini, 2020 ; Garcia, 2022].

Les protéines à centre Fe-S sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires (**Figure 11**). Étant donné leur rôle central dans la physiologie cellulaire, tout défaut dans la biogénèse de ces centres ou dans leur insertion dans des protéines essentielles peut entraîner un dysfonctionnement cellulaire et des pathologies chez l'Homme [Rouault, 2008]. Par exemple, dans des maladies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedreich, une mutation dans un intron du gène codant pour la frataxine, une protéine clé de l'homéostasie du fer cellulaire, peut inhiber la transcription de l'ARN messager correspondant. Une expression réduite de la frataxine entraîne des déficiences dans la synthèse de toutes les métalloenzymes contenant du fer, y compris les enzymes mitochondriales à centre Fe-S. Cette situation est aggravée par l'accumulation de fer et d'ERO mitochondriaux [Llorens, 2019 ; Isaya, 2014]. Cela résulte en une défaillance mitochondriale qui, à long terme, conduit à une dégénérescence des structures cérébelleuses [Llorens, 2019 ; Isaya, 2014].

## II.3. Biogenèse des clusters [Fe-S]

Alors qu'on a longtemps pensé que la formation des clusters [Fe-S] était spontanée, des recherches menées depuis les années 90 ont montré qu'en réalité la synthèse in vivo de telles structures requiert un système enzymatique [Jacobson, 1989]. L'étude d'organismes modèles procaryotes et eucaryotes a démontré l'existence de trois grandes catégories de machinerie enzymatique catalysant leur synthèse : la machinerie Iron-Sulfur Cluster (ou ISC), la machinerie Sulfur mobilisation (ou SUF) et enfin la machinerie Cytosolic Iron-Sulfur cluster Assembly (ou CIA) [Ayala-Castro, 2008 ; Roche, 2013 ; Beilschmidt, 2014 ; Sharma, 2010].



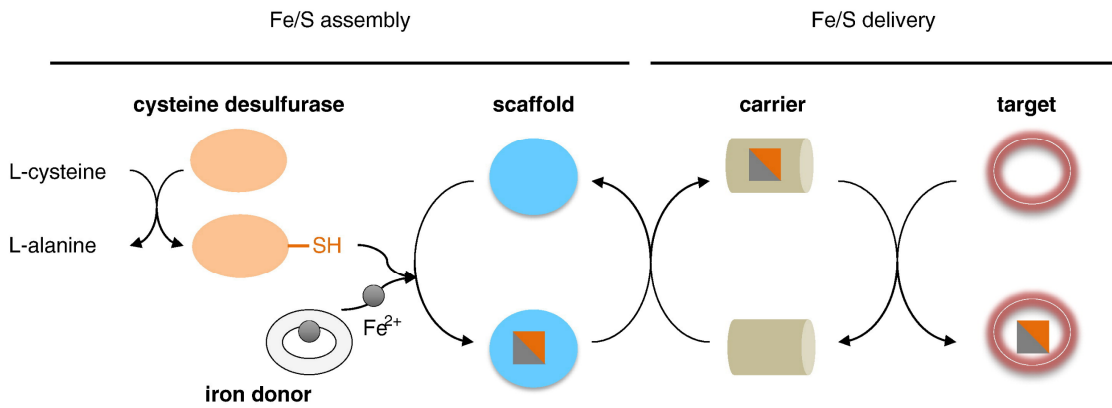
**Figure 11 : Les différentes fonctions des protéines à centres [Fe-S] dans les cellules [Boncella 2022].**

Une dernière catégorie comprend la machinerie Nitrogen Fixation (ou NIF) qui est spécifique de la maturation de la nitrogénase [Jacobson, 1989 ; Zheng, 1998]. Alors que ISC et SUF sont présents chez les procaryotes ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes [Tsaousis, 2019 ; Lill, 2020], CIA est présente uniquement chez les eucaryotes au niveau du cytoplasme [Sharma, 2010]. On se restreindra ici à la mention des systèmes de synthèse procaryotes. Récemment, il a été montré que deux autres machineries additionnelles minimales MIS et SMS sont probablement apparues en premier chez LUCA (pour Last Universal Common Ancestor), puis se sont évolutivement diversifiés pour donner les autres [Garcia, 2022]. Ces systèmes minimaux, encore retrouvés chez certaines archées méthanogènes, seront décrits dans la discussion du projet numéro 1 de cette thèse.

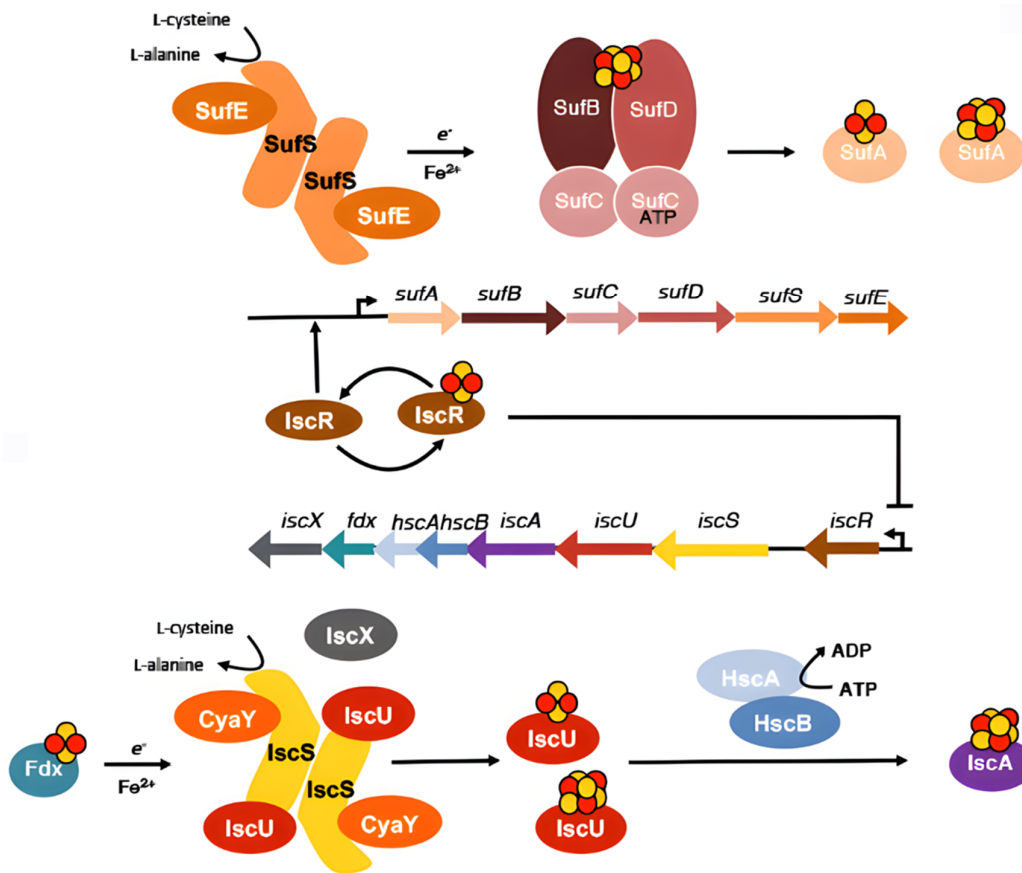
La synthèse d'un cluster [Fe-S] et son insertion dans une apoprotéine cible suivent des principes similaires malgré l'implication de machineries différentes. L'assemblage du soufre et du fer, apportés par des partenaires protéiques, s'effectue d'abord sur une protéine d'échafaudage. Le cluster Fe-S ainsi formé est ensuite transporté et inséré dans l'apoprotéine cible [Andreini, 2020] (**Figure 12**).

### II.3.1. Le système ISC

Caractérisé pour la première fois chez *Azotobacter vinelandii* [Zheng, 1998] et par la suite particulièrement étudié chez *E. coli*, le système ISC est utilisé aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Ce système est codé par une série de gènes organisés en opéron à savoir : *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA*, *fdx* et *iscX* [Shepard, 2011 ; Andreini, 2020 ; Ayala-castro, 2008 ; Roche, 2013]. Le gène *iscR* (Iron-sulfur cluster regulator) code pour un régulateur transcriptionnel contenant un cluster [Fe-S] sous forme [2Fe2S] qui dépend de la machinerie ISC pour sa synthèse et son insertion. La protéine IscR réprime en continu l'expression des autres gènes contenus dans l'opéron. Lorsque la synthèse des clusters [Fe-S] est perturbée, le régulateur IscR privé de son cluster [Fe-S] ne peut plus assurer sa fonction physiologique, ce qui conduit à une levée de l'inhibition de l'expression des autres gènes de l'opéron (**Figure 13**) [Ayala-castro, 2008 ; Rajagopalan, 2013 ; Vinella, 2013].



**Figure 12 : Les étapes de la biosynthèse des centres fer-soufre [Roche, 2013].** La L-cystéine est la source principale de soufre dans la cellule. Les cystéine désulfurases retirent le soufre de la cystéine et le transfèrent à une protéine échafaudage. Lors de cette étape, des cofacteurs protéiques fournissent les atomes de fer nécessaires et l'assemblage des clusters fer-soufre s'effectue sur la protéine échafaudage. Ensuite, des protéines chaperonnes prennent en charge le centre Fe-S nouvellement formé et l'insèrent dans la protéine cible appropriée.



**Figure 13 : Les systèmes ISC et SUF : opérons et protéines encodées [Mendel 2020].**

Le gène *IscS* code pour une cystéine désulfurase qui fournit le soufre pour la synthèse du centre [2Fe2S] et *IscU* code pour une protéine d'échafaudage au niveau de laquelle le centre est assemblé (Cf. section III). Le gène *IscA* code pour une protéine impliquée dans la synthèse des centres [4Fe-4S] et leur transfert ultérieur vers les protéines réceptrices. Les gènes *hscA* et *hscB* produisent des protéines chaperonnes qui gèrent les clusters [Fe-S] préalablement synthétisés sur *IscU* et aident à leur transfert vers les apoprotéines cibles [Lill, 2020]. Enfin le rôle des protéines codées par *fdx* et *iscX* reste encore à élucider [Srouf, 2020].

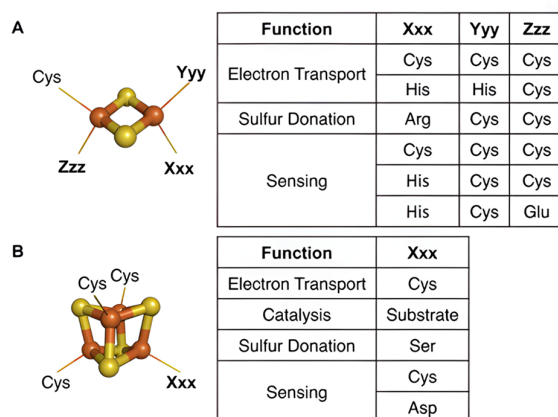
### II.3.2. Le système SUF

Le système SUF a été particulièrement bien caractérisé chez *E. coli*, chez qui il est exprimé en complément du système ISC, en réponse à un stress cellulaire. En effet, le système SUF est sous contrôle de plusieurs régulateurs transcriptionnels qui réagissent au stress oxydatif (*OxyR* et *NsrR*), à la carence en fer (*Fur*). Il réagit également au dysfonctionnement de la synthèse de cluster [Fe-S] par le système ISC, via la protéine *IscR* qui régule positivement l'activité de SUF lorsqu'elle est sous forme apoprotéine (**Figure 13**) [Mendel 2020].

Le système SUF se présente lui aussi sous forme d'opéron comprenant 6 gènes nommés *sufA*, *sufB*, *sufC*, *sufD*, *sufE* et *sufS*. Les gènes *sufE* et *sufS* codent pour un complexe hétérodimérique possédant une activité cystéine désulfurase qui fournit le soufre nécessaire à la formation des centres Fe-S. Les atomes de soufre et de fer sont assemblés en cluster [Fe-S] au sein d'un complexe formé par les protéines d'assemblage *sufB*, l'ATPase *sufC* et *sufD*. Le gène *sufA* code pour la protéine assurant le transport du cluster [Fe-S] vers une apoprotéine cible [Pérard, 2017 ; Andreini, 2020] (**Figure 13**).

## II.4. Diversité des clusters [Fe-S]

Les centres fer-soufre, une fois synthétisés, sont insérés dans des apo-protéines. Ils sont associés à la protéine par des liaisons entre les atomes de fer et les chaînes latérales de résidus cystéine, histidine, sérine, arginine, glutamate et/ou encore aspartate (**Figure 14**). Certains atomes de fer du cluster [Fe-S] peuvent également interagir avec le substrat ou le produit de la réaction catalysée par une enzyme.



**Figure 14 : Diversité des acides aminés capables de chélater les centres fer-soufre,** illustrée par des exemples de centres  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  (**A**) et  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  (**B**) [Boncella, 2022]. Les fonctions physiologiques en fonction de la liaison de chaque type de clusters sont également indiquées.



### II.4.1. Types de clusters [Fe-S]

- **Les centres Fe-S communs**

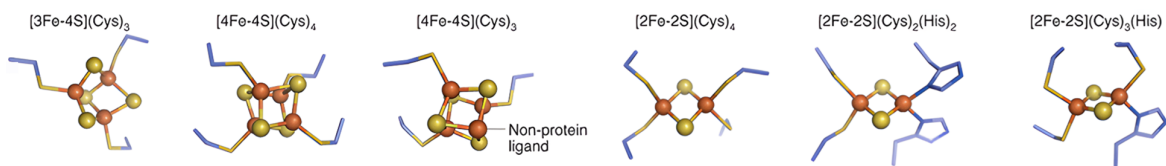
Les clusters [Fe-S] se distinguent par diverses configurations selon le nombre d'atomes de fer et de soufre qu'ils contiennent, ainsi que par l'état d'oxydation du fer (le soufre reste quant à lui à un état d'oxydation de -2). Le fer peut être présent sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Les centres les plus courants sont de type [2Fe-2S] (centres rhombiques) et [4Fe-4S] (centres cubiques). Selon la proportion d'ions ferriques et ferreux, ces clusters peuvent adopter différentes formes oxydées ou réduites, telles que  $[\text{2Fe2S}]^{2+}$ ,  $[\text{2Fe2S}]^+$ ,  $[\text{4Fe4S}]^{3+}$ ,  $[\text{4Fe4S}]^{2+}$  et  $[\text{4Fe4S}]^+$ . Les centres de types [3Fe4S], produits de dégradation d'un centre [4Fe4S], sont également fréquemment retrouvés dans les protéines à centre fer-soufre. Ces derniers existent sous les formes oxydées ou réduites  $[\text{3Fe4S}]^+$  ou  $[\text{3Fe4S}]^0$  [Boncella, 2022] (**Figure 15**). Diverses fonctions physiologiques sont associées à un ou plusieurs types de centres [Fe-S] (**Tableau 1**). Les spécificités physico-chimiques des différents types de centres fer-soufre peuvent être exploitées expérimentalement pour les distinguer par diverses techniques spectroscopiques (**Tableau 2**) [Jarrett, 2013].

- **Les centres Fe-S atypiques**

D'autres formes plus « exotiques » de centres fer-soufre peuvent exister. On peut citer notamment comme exemple la nitrogénase qui possède deux centres atypiques : un centre [8Fe7S] (cluster P) et un centre [Mo7Fe9S-C-homocitrate] (cluster M), dans lequel un atome de molybdène remplace un atome de fer [Jenner, 2021].

### II.5. Diversité d'utilisation des clusters [Fe-S] en biologie

Les protéines contenant des centres Fe-S remplissent une multitude de fonctions qui peuvent être classées en trois catégories principales : (1) fonctions non catalytiques, (2) fonctions catalytiques redox, et (3) fonctions catalytiques non redox. Ces fonctions sont essentielles pour une variété de processus biologiques détaillés ci-après.



**Figure 15 : Six configurations courantes de clusters fer-soufre, illustrant leur diversité structurale [Ebrahimi, 2022].**

**Tableau 1 : Corrélation entre les types de clusters fer-soufre et leurs fonctions cellulaires [Boncella 2022].**

Functional Roles of Fe-S Clusters	[Fe] Centers	[Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ] Clusters	[Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ] Clusters	[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] Clusters	Complex Fe-S Clusters
Electron Transport	✓	✓	✓	✓	✓
Catalysis		✓		✓	✓
Sulfur Donation		✓		✓	✓
Sensing		✓	✓	✓	✓

**Tableau 2 : Constantes physiques et paramètres spectroscopiques typiques associés à chaque type de centres fer-soufre (basés sur des études de clusters de ferrédoxines bactériennes) [Jarrett, 2013]. Les abréviations sont utilisées pour indiquer : n.d. (non déterminé) et n.s. (pas de signal).**

Cluster Type	E <sub>m</sub> value (reduction) (mV)	UV/Visible absorption (λ <sub>max</sub> , nm)	EPR parameters (g <sub>1</sub> , g <sub>2</sub> Or g <sub>av</sub> )	Mössbauer parameters	
				δ (mm/s)	ΔE <sub>Q</sub> (mm/s)
[Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	-440 to -175	330, 420, 460	n.s.	0.25-0.3	0.5-1.0
[Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	n.d.	550	1.94, 2.02	0.25, 0.5-0.7	0.6, 2-4
[Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-425 to -130	400 - 430	2.01	0.25-0.3	0.5-0.6
[Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>0</sup>	n.d.	n.d.	n.s.	0.3, 0.45-0.5	0.5, 1.5
[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>3+</sup>	+120 to +360	310, 380, 450	2.03, 2.14	0.25-0.3, 0.4-0.45	0.8-0.9, 0.9-1.1
[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup>	-650 to -280	380 - 400	n.s.	0.45-0.5	1.0-1.5
[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	n.d.	n.d.	1.94, 2.02	0.45-0.5, 0.55-0.7	1.0-1.5, 1.5-2

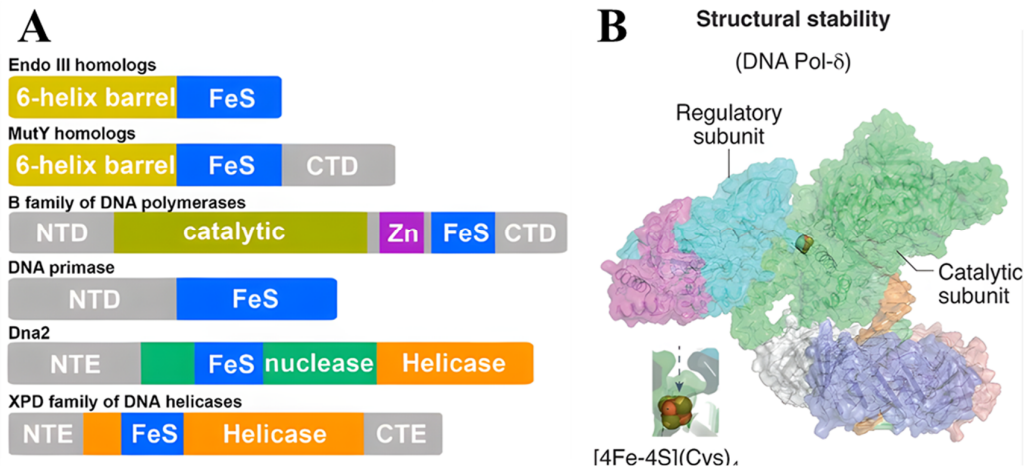
### II.5.1. Rôles non-catalytiques des centres [Fe-S]

- **Centres Fe-S et maintenance de l'ADN**

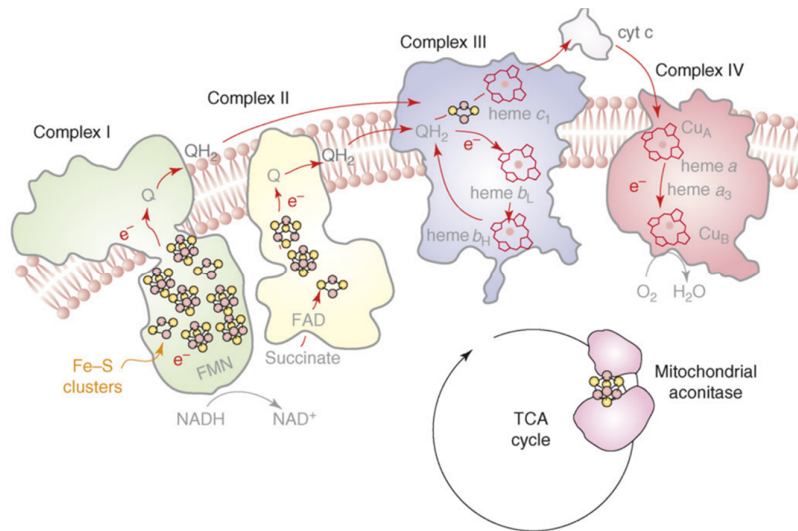
Les centres fer-soufre (Fe-S) sont intégrés dans de nombreuses protéines essentielles à la réplication de l'ADN, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (**Figure 16A**) [Khodour, 2019 ; Genereux, 2010 ; Ebrahimi, 2022]. Parmi celles-ci, les hélicases, telles que l'hélicase XPD, qui déroulent la double hélice de l'ADN, et les polymérases, en charge de la synthèse des nouveaux brins d'ADN, contiennent notamment des centres Fe-S. Le [4Fe-4S] de la Polymérase- $\delta$  contribue par exemple à la stabilité structurelle et à la fonctionnalité du complexe protéique (**Figure 16B**) [Khodour, 2019 ; Genereux, 2010 ; Ebrahimi, 2022]. En outre, certaines protéines engagées dans les systèmes de réparation de l'ADN, y compris la protéine XPD, possèdent des centres Fe-S essentiels à la détection des dommages induits dans l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) [Khodour, 2019 ; Genereux, 2010]. En effet, lorsqu'une lésion engendre la formation d'un radical, celui-ci peut oxyder le centre Fe-S de XPD, favorisant ainsi une liaison stable entre la protéine et l'ADN afin de recruter des protéines de réparation de l'ADN [Fuss, 2015]. Enfin, un certain nombre d'enzymes de modification de l'ARNt utilisent des centres Fe-S catalytiques (Cf. section IV).

#### **Centres Fe-S et transfert d'électrons : une fonction essentielle chez les eucaryotes et les procaryotes**

Chez les eucaryotes, les centres Fe-S participent aux processus métaboliques liés à la production d'énergie grâce à leur large gamme de potentiels redox. En effet, les trois premiers complexes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, notés I, II et III, comprennent au total douze centres Fe-S qui facilitent le transfert d'électrons depuis les donneurs NADH et FADH<sub>2</sub> (**Figure 17**). Ce transfert d'électron suit un gradient de potentiel redox dicté par les différents types de centres Fe-S et s'accompagne du déplacement de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce processus établit un gradient protonique intermembranaire qui, lorsqu'il est dissipé par le complexe V (ou ATP synthase), entraîne la production d'ATP [Read, 2021 ; Ohnishi, 1998]. Un mécanisme similaire est observé chez les procaryotes, où des complexes de protéines à centres Fe-S situés dans le périplasme permettent le transfert des protons du cytoplasme vers le périplasme, formant ainsi un gradient protonique exploité par l'ATP synthase membranaire pour produire de l'ATP [Kaila, 2021].



**Figure 16 :** (A) Exemples de protéines avec des clusters [Fe-S] impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques [Fuss, 2015]. (B) Le cluster [4Fe-4S] situé à l'interface entre les sous-unités catalytiques et régulatrices de l'ADN Pol-δ est essentiel à l'intégrité structurelle du complexe [Ebrahimi, 2022].



**Figure 17 :** Les centres fer-soufre des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale contribuent à établir le gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP en couplant le transport de protons ( $H^+$ ) et d'électrons ( $e^-$ ) [Rouault, 2008]. Il convient de souligner que le centre fer-soufre de l'aconitase, enzyme cruciale du cycle de Krebs (désigné par 'TCA cycle' sur le schéma), joue un rôle distinct des centres de la chaîne respiratoire, agissant comme catalyseur dans une réaction qui n'implique pas d'oxydoréduction.

Enfin, les centres fer-soufre de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique jouent également un rôle essentiel lors de la phase lumineuse de la photosynthèse. Ils facilitent le transfert couplé d'électrons et de protons, conduisant non seulement à la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH mais également à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase située dans la membrane des thylakoïdes [Johnson, 2016 ; Schmidt, 2020]. Au-delà de ces rôles, les centres Fe-S servent aussi de cofacteurs catalytiques dans diverses réactions.

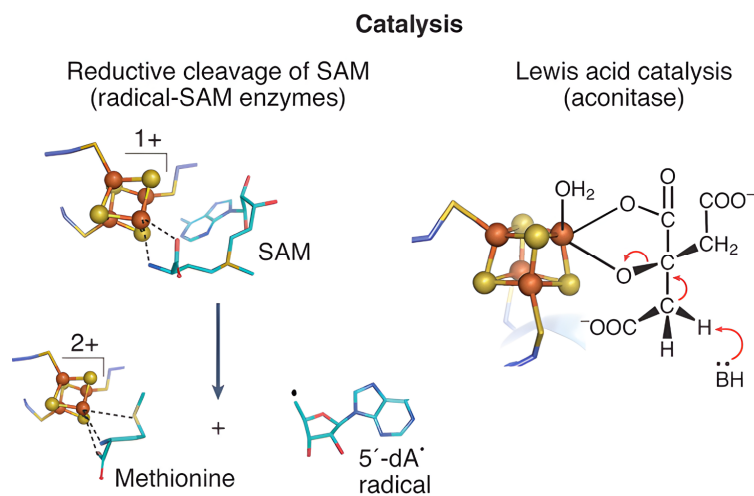
### II.5.2. Rôles catalytiques des centres [Fe-S] dans les réactions enzymatiques redox

L'utilisation de centres [Fe-S] dans des réactions redox est illustrée par les enzymes de la superfamille radical-SAM contenant un cluster [4Fe4S] qui possède un site de liaison pour le cofacteur S-adenosyl méthionine (SAM) [Nicolet, 2022 ; Booker, 2023]. La liaison au SAM permet à l'enzyme de réduire et cliver le SAM via un changement d'état d'oxydation du cluster de [4Fe-4S]<sup>+</sup> à [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (**Figure 18**). Ce processus génère de la méthionine et un intermédiaire radicalaire 5'-désoxyadénosyle (5'-dAdo●) hautement réactif, qui à son tour peut faciliter une variété de réactions chimiques, y compris l'isomérisation, le transfert de radical, la décarboxylation, et l'insertion de groupes thiométhyle ou d'atomes de soufre [Nicolet, 2022 ; Booker, 2023]. Ces enzymes sont cruciales pour divers processus biologiques, tels que le métabolisme des lipides, la biosynthèse de vitamines et les modifications d'ARNt [Booker, 2023]. Les mécanismes d'insertion de soufre mis en œuvre par la biotine synthase BioB et la lipoate synthase LipA, qui utilisent cette chimie radicalaire, seront détaillés dans la section IV de cette introduction.

### II.5.3. Rôles catalytiques des centres [Fe-S] dans les réactions enzymatiques non-redox

Les centres [Fe-S] dont un des atomes de fer n'est pas coordonné à la protéine, peuvent participer à des réactions non-redox. Le site de coordination libre de cet atome de fer peut se lier à un substrat, agissant alors comme un acide de Lewis durant la réaction catalytique [Flint, 1996]. Un exemple bien caractérisé est celui de l'aconitase, une hydrolase qui catalyse l'isomérisation du citrate en isocitrate via sa déshydratation intermédiaire en cis-aconitate. En absence de substrat, l'enzyme contient un cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> coordonné par trois résidus cystéines et une molécule d'eau liée au fer non coordonné à la protéine (**Figure 18**).

Le citrate se lie ensuite à ce fer via son groupe hydroxyle, facilitant ainsi la réaction de déshydratation/hydratation nécessaire à son isomérisation en isocitrate [Lloyd, 2008]. Cette utilisation non-redox de centres Fe-S est impliquée non seulement dans des réactions de déshydratation mais aussi dans des réactions de sulfuration, dont les mécanismes seront détaillés dans la section IV de cette introduction. Les deux protéines étudiées dans les projets de cette thèse appartiennent également à cette catégorie d'enzymes à centres [Fe-S].



**Figure 18 : Rôles catalytiques des centres [Fe-S] dans les métalloenzymes [Ebrahimi, 2022]. (À gauche)** Dans les enzymes radical-SAM, le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  réduit la S-adénosylméthionine (SAM) pour générer l'intermédiaire radicalaire 5'-désoxyadénosyle (5'-dAdo●), qui est ensuite utilisé pour initier une variété de réactions chimiques. **(À droite)** Dans l'aconitase, le cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  agit comme un acide de Lewis pour faciliter l'isomérisation du citrate en isocitrate. D'après

### **III. Mécanismes enzymatiques de mobilisation du soufre en biologie**

Les cellules emploient un système de relais enzymatique pour transférer le soufre depuis la cystéine vers les protéines responsables de la biosynthèse de diverses biomolécules soufrées (Cf. Introduction I.3). La régulation de ce flux de soufre est principalement contrôlée par la concentration intracellulaire de cystéine et par la modulation de l'expression des protéines concernées en réponse à différents stimuli, tels que le stress oxydatif ou les variations de la biodisponibilité du fer pour la cellule [Outten, 2004 ; Lee, 2004 ; Leimkühler, 2017].

En lien avec le projet numéro 1, il s'agit ici de présenter les caractéristiques des L-cystéine désulfurases, des enzymes essentielles pour la mobilisation du soufre à partir de la L-cystéine et qui opèrent via la formation d'intermédiaires persulfures [Schwartz, 2000 ; Lauhon, 2000 ; Black, 2015 ; Das, 2021]. Le 3-mercaptopyruvate peut également être utilisé comme source de soufre pour former un intermédiaire persulfure qui est redistribué à différents accepteurs [Pedre, 2021 ; Pedre, 2023 ; Lec, 2018]. Enfin, l'identification d'une cystéine désulfidase capable de réaliser la désulfuration de la cystéine via un cluster [Fe-S] catalytique, chez certains organismes dépourvus de cystéine désulfurase [Kotera, 2010], suggère que cette nouvelle classe d'enzymes pourrait également jouer un rôle dans la voie de mobilisation du soufre depuis la cystéine [Tchong, 2005].

#### **III.1. Mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation de persulfures**

Le soufre sous forme de persulfure (RSSH) constitue la forme majoritaire de sulfane dans les systèmes biologiques, avec une concentration cellulaire de l'ordre d'une centaine de  $\mu\text{M}$  [Ida, 2014 ; Sawa, 2020 ; Hansen, 2009 ; Francioso, 2020]. L'une des utilisations principales du sulfane par la cellule est la persulfuration des résidus cystéines des protéines (Cys-SSH) [Mustafa, 2009 ; Filipovic, 2018 ; Toohey, 2014]. Bien qu'elle puisse se produire de manière non enzymatique, la persulfuration des protéines intracellulaires est principalement catalysée par des sulfurtransférases [Miranda, 2014 ; Filipovic, 2018 ; Toohey, 2011 ; Cuevasanta, 2015]. Au sein de cette classe d'enzymes, les cystéines désulfurases catalysent la désulfuration de la L-cystéine en L-alanine en générant simultanément un intermédiaire persulfure attaché au

résidu cystéine conservé de l'enzyme (Cys-SSH) (**Figure 5A**) [Hidese, 2011 ; Das, 2021]. Le soufre terminal de ce groupe persulfure peut ensuite être transféré à une molécule réceptrice par une réaction de transpersulfuration pour former une liaison disulfure (Cys-S-S-R) (**Figures 5A et 19**) [Mihara, 2002 ; Hidese, 2011 ; Black, 2015 ; Das, 2021].



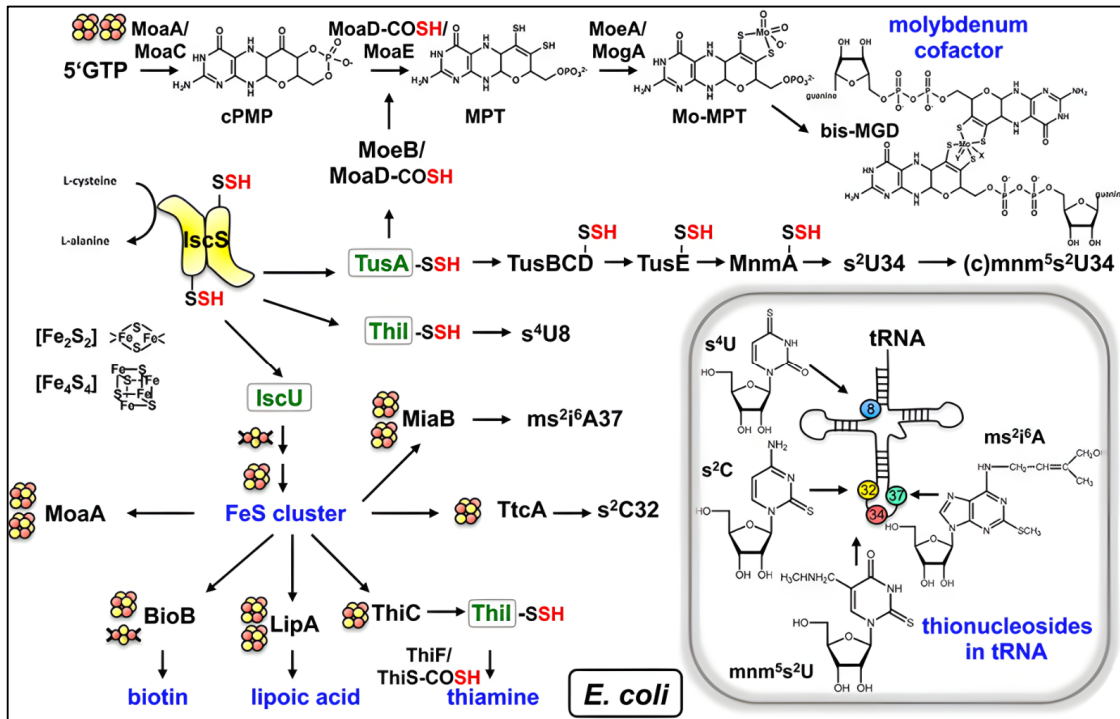
### III.1.1. Mobilisation enzymatique du soufre à partir de la L-cystéine par la famille des L-cystéine désulfurases

#### III.1.1.1. Distribution et fonction des L-cystéine désulfurases

Les cystéines désulfurases telles que NifS, IscS, SufS et CsdA, sont présentes dans la grande majorité des domaines de la vie et ont été hautement conservées au cours de l'évolution [Garcia, 2022]. Par exemple, l'identité de séquence atteint 60 % entre la L-cystéine désulfurase IscS d'*E. coli* et son homologue humain, NFS1 [Hidese 2011 ; Lemkühler, 2017].

La biosynthèse des clusters fer-soufre a été la première voie biochimique identifiée comme nécessitant l'intervention d'une cystéine désulfurase [Zheng 1993 ; Zheng, 1998], avec notamment les cystéines désulfurases IscS et SufS qui interagissent respectivement avec les protéines échafaudages IscU et SufU (cf. Introduction II) [Albrecht, 2010]. Les gènes de ces cystéines désulfurases sont ainsi généralement inclus dans les opérons des systèmes de biogenèse des clusters [Fe-S], tels que NIF, ISC et SUF (cf. Introduction II) [Black, 2015 ; Das, 2021]. En outre, les cystéines désulfurases peuvent également mobiliser le soufre pour le transférer directement ou indirectement à des enzymes de thiolation pour la synthèse de biomolécules soufrées (**Figure 19**). Par exemple, l'enzyme IscS d'*E. coli* peut notamment fournir du soufre à plusieurs protéines différentes : TusA, qui est impliquée dans la voie de biosynthèse de la 2-thiouridine en position 34 des ARNt [Ikeuchi, 2006] et du cofacteur Moco [Lauhon, 2000] ; et ThiI, qui participe à la biosynthèse de la thiamine [Taylor, 1998] ainsi que de la 4-thiouridine en position 8 des ARNt (**Figure 19**) [Kambampati, 1999].

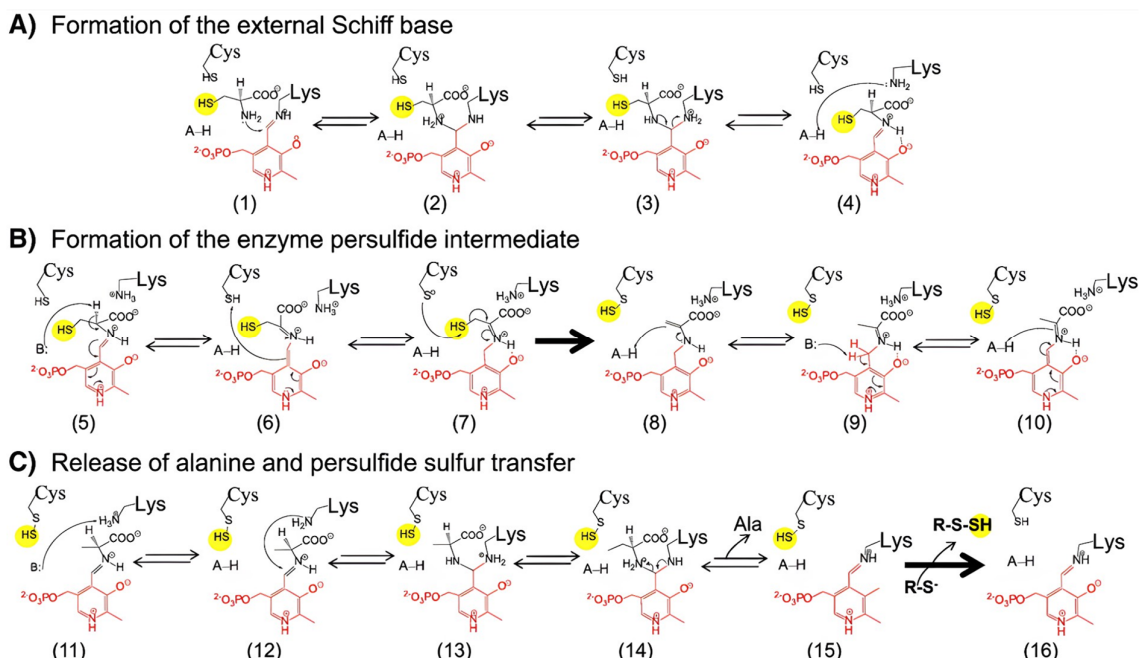
L'implication des cystéines désulfurases dans ces différentes voies de biosynthèse de biomolécules soufrées se révèle *in vivo* par l'effet de la délétion des gènes correspondants. Par exemple, le mutant de délétion  $\Delta$ IscS chez *E. coli* a des ARNt qui ne possèdent pas de 4-thiouridine et est auxotrophe pour la thiamine et l'acide nicotinique [Lauhon, 2000 ; Schwartz, 2000]. De plus, la croissance cellulaire du mutant est également impactée, suggérant des niveaux réduits de clusters [Fe-S] [Schwartz, 2000 ; Lauhon, 2002 ; Black, 2015].



**Figure 19 : Voies de transfert du soufre à partir de la L-cystéine via la cystéine désulfurase IscS dans *E. coli*** [Lemkühler, 2017]. Les protéines qui reçoivent directement le soufre de la L-cystéine désulfurase sont marquées en vert : ThiI, IscU, et TusA. ThiI catalyse la formation du s<sup>4</sup>U et interagit avec ThiF et ThiS pour la synthèse de la thiamine. Les enzymes relais impliquées dans la biosynthèse des molécules sulfurées sont également indiquées. TusA participe à la sulfuration de la biotine et de l'acide lipoïque, ainsi qu'au transfert du soufre de la cystéine vers s<sup>2</sup>U avec l'assistance de la cystéine désulfurase, du complexe TusBCD, de TusE et de MnmA. TusA est aussi impliqué dans l'intégration du soufre dans le cofacteur Moco en coopération avec MoeB et MoaD. IscU participe au transfert des clusters [Fe-S] aux protéines concernées, dont BioB, LipA, TtcA, et MiaB, lesquelles sont impliquées dans la sulfuration de la biotine, de l'acide lipoïque, du la cytosine en position 32 des ARNt, et de i<sup>6</sup>A en position 37 des ARNt, respectivement. Les thiomodifications des nucléosides de l'ARNt liées à la mobilisation du soufre par la cystéine désulfurase, sont indiquées dans l'encadré. Les groupes persulfure et thiocarboxylate sont représentés respectivement par -SSH et -COSH.

### III.1.1.2. Mécanisme catalytique des L-cystéine désulfurases

L'activité enzymatique des cystéine désulfurases dépend du cofacteur PLP, qui est lié à la protéine par un résidu de lysine (**Figure 20**). Le mécanisme enzymatique des cystéine désulfurases se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, le groupe aldéhyde du PLP forme une liaison aldimine avec le groupement amine de la cystéine substrat, ce qui facilite l'abstraction du proton du carbone alpha du substrat par un résidu enzymatique agissant comme une base [Black, 2015 ; Das, 2021]. Ensuite, le thiol déprotoné de la cystéine catalytique de l'enzyme réalise une attaque nucléophile sur le substrat, conduisant à la formation d'un persulfure et d'un adduit d'alanine lié au PLP (**Figure 20**). Finalement, le soufre du persulfure est transféré à une protéine accepteuse par transpersulfuration. Pour cela, le persulfure de la cystéine désulfurase peut réaliser une attaque nucléophile sur le résidu accepteur de soufre, ou inversement [Mueller, 2006 ; Black, 2015]. La spécificité de la réaction de transpersulfuration varie selon les cystéine désulfurases et les protéines acceptrices du soufre [Outten, 2003 ; Selbach, 2010 ; Cartini, 2011 ; Dai, 2012 ; Kambampati, 1999 ; Das, 2021]. Par exemple, SufS d'*E. coli* ou de *B. subtilis* montre une activité de transpersulfuration accrue lorsqu'elle interagit avec SufE ou SufU, tant *in vivo* qu'*in vitro*, un effet non observé avec l'interaction IscS/IscU [Selbach, 2010 ; Selbach, 2013 ; Das, 2021]. En revanche, IscS peut interagir *in vivo* avec différents partenaires tels qu'IscU, ThiI et TusA, ce qui contraste avec les interactions plus spécifiques de SufS avec SufE ou SufU [Leimkühler, 2017]. Enfin, en l'absence d'un accepteur de soufre dans le milieu réactionnel *in vitro*, le devenir du persulfure lié à la cystéine désulfurase est influencé par l'environnement redox. Dans un milieu réducteur, le persulfure peut se dissocier pour libérer du sulfure ou de l'hydrogène sulfuré. En revanche, dans un milieu moins réducteur, il est susceptible de former des espèces polysulfures avec un autre groupement thiol proche [Dos Santos, 2017].



**Figure 20 : Mécanisme catalytique proposé pour la réaction de désulfuration de la L-cystéine par la L-cystéine désulfurase [Black, 2015].**

(A) La réaction débute par la liaison du substrat cystéine au cofacteur PLP, transformant la Lys-aldimine interne (1) en Cys-aldimine externe (4-5) en passant par les intermédiaires Cys-diamine (2-3).

(B) L'abstraction du proton alpha conduit à la formation de Cys-quinonoïde (6) et à la génération du Cys-cétimine (7), entraînant la création d'une liaison persulfure ainsi que de l'intermédiaire Ala-énamine (8), qui se convertit en Ala-cétimine (9) puis en Ala-quinonoïde (10).

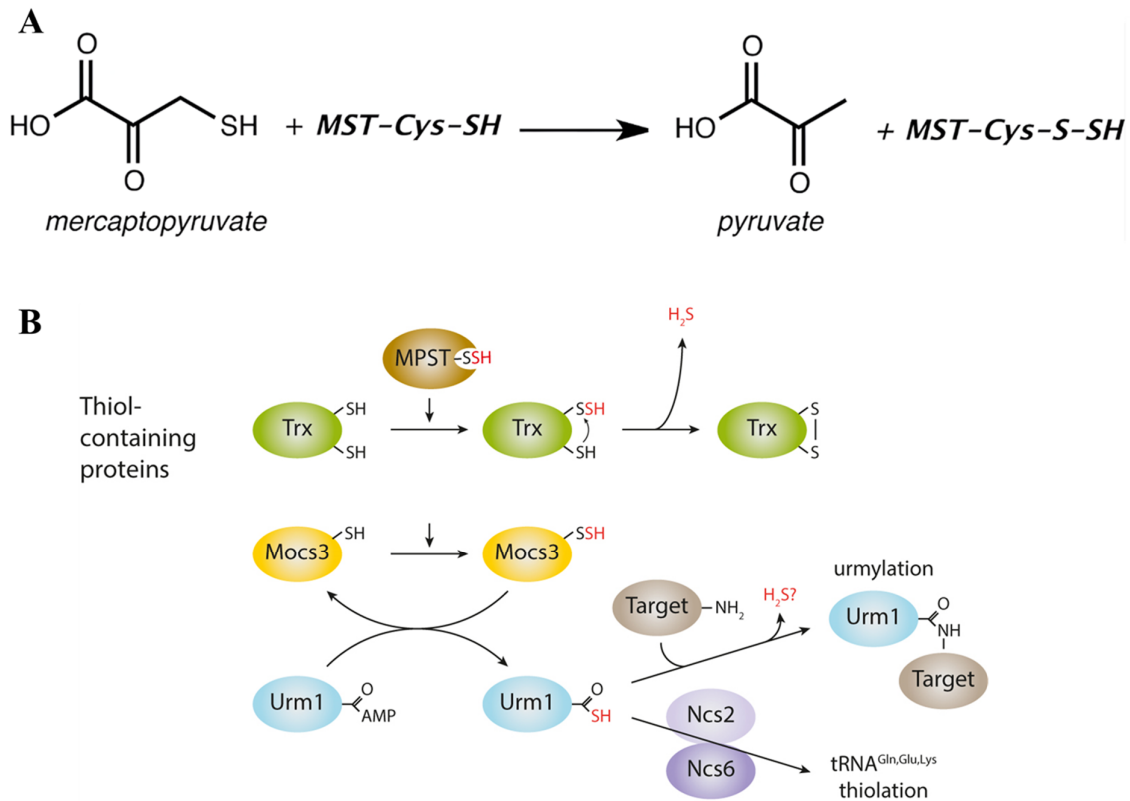
(C) L'alanine est libérée et le soufre est transféré dans le sens inverse de la liaison initiale du substrat, passant par les intermédiaires Ala-aldimine (11-12), Ala-diamine (13-14) et revenant à la Lys-aldimine (15). Le soufre est ensuite transféré à une protéine acceptrice (R-S-), réinitialisant ainsi l'enzyme pour le cycle catalytique suivant (16).

Le mécanisme implique la coordination du PLP par la lysine, l'intervention du résidu cystéine catalytique et la présence d'au moins un autre résidu agissant comme un acide (A-H) et une base (B:) dans la réaction.

### III.1.2. Mobilisation enzymatique du soufre à partir du 3-mercaptopyruvate par la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (MPST)

Des études protéomiques récentes montrent que la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (MPST) humaine joue également un rôle dans la mobilisation et la redistribution du soufre à partir du 3-mercaptopyruvate [Pedre, 2021 ; Pedre, 2023]. Cette enzyme appartient à la famille des sulfurtransférases à domaine rhodanèse, qui inclut notamment la thiosulfate sulfurtransférase (TST), et qui sont impliquées dans diverses voies métaboliques du soufre (**Figures 6 et 21B**) [Bordo, 2002 ; Cipollone, 2007 ; Termathe, 2021 ; Alsohaibani, 2023].

La MPST est responsable de la désulfuration du 3-mercaptopyruvate (3MP), un sous-produit du catabolisme de la cystéine, qui conduit à la formation de pyruvate et d'un intermédiaire persulfure lié à un résidu cystéine de l'enzyme (**Figures 21A**) [Lec et al. 2018]. Ce persulfure peut ensuite être transféré à des accepteurs de thiol, qu'ils soient physiologiques ou artificiels, par transpersulfuration [Cipollone, 2007 ; Pedre, 2021 ; Alphey, 2003 ; Alsohaibani, 2023]. Contrairement aux cystéine désulfurases qui utilisent le PLP, le mécanisme catalytique proposé pour la MPST suggère que l'enzyme est capable de rompre une liaison C-S sans nécessiter ce cofacteur [Lec et al. 2018]. Cette spécificité pourrait être due au substrat 3-mercaptopyruvate, dont le groupe thiol est potentiellement plus réactif que celui de la cystéine [Pedre, 2023]. Après l'identification de la thioredoxine, associée à la production de H<sub>2</sub>S [Yadav, 2013 ; Pedre, 2023], et de MOCS3/Uba4, impliqué dans la thiolation de l'ARNt et l'urmylation des protéines (**Figures 21B**) [Noma, 2009 ; Juedes, 2016 ; Pedre, 2023 ; Alsohaibani, 2023], plus d'une soixantaine de partenaires physiologiques potentiels ont été identifiés du fait de leur faible taux de persulfuration suivant la délétion du gène *mpst* [Pedre, 2023].



**Figure 21 : (A) Réaction de desulfuration du 3-mercaptopyruvate par la Mercaptopyruvate sulfurtransférase (MPST ou MST) humaine résultant en la formation d'un persulfure lié à l'enzyme (-S-SH) et une molécule de pyruvate [Yadav, 2013].**

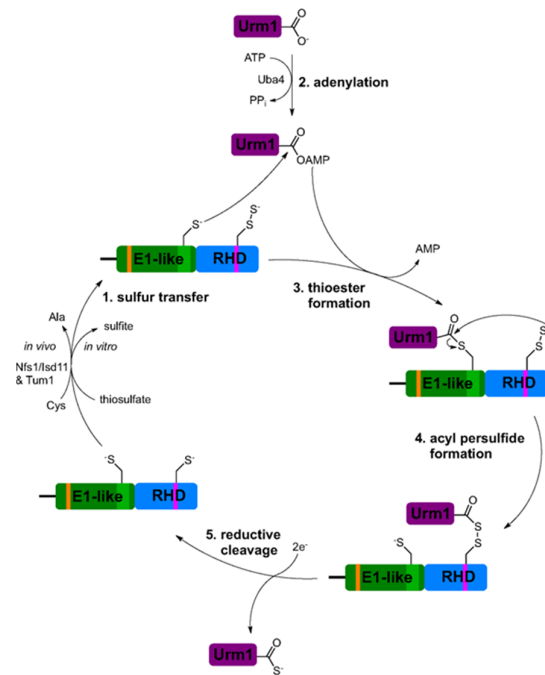
**(B) Accepteurs de soufre pour la MPST [Pedre, 2021] :** Parmi les protéines contenant des thiols, la thiorédoxine (Trx) et la sulfotransférase Mocs3 sont les seuls accepteurs connus. Dans le cas de la Trx, le persulfure est rapidement attaqué par un thiol voisin, ce qui entraîne la libération de H<sub>2</sub>S et la formation d'un disulfure intramoléculaire. Pour Mocs3, l'atome de soufre externe du persulfure est transféré à la protéine Urm1 (ubiquitin-related modifier 1), formant un thiocarboxylate (COSH) à son extrémité C-terminale. L'Urm1 thiocarboxylée peut soit contribuer à l'urmylation des protéines, soit transférer son soufre pour la thiolation de l'ARNt. La MPST est aussi capable de transférer son persulfure à des molécules comme la L-cystéine (L-Cys), le glutathion (GSH) et l'acide dihydrolipoïque (DHLA). Le cyanure (CN<sup>-</sup>) est également un accepteur de soufre de la MPST, formant du thiocyanate (SCN<sup>-</sup>), qui est moins toxique.

### III.1.3. Relais de transfert de soufre par l'intermédiaire d'un thiocarboxylate

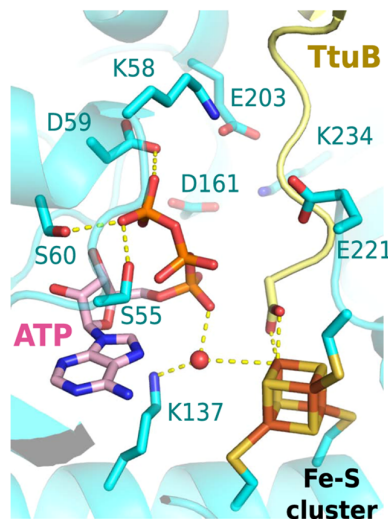
Les persulfures formés par les cystéines désulfurases ou la MPST peuvent former un thiocarboxylate sur certaines protéines acceptrices. Celui-ci peut alors servir de relais intermédiaire pour le transfert de soufre vers des enzymes de thiolation situées en aval dans la voie de biosynthèse de certains composés soufrés [Leimkühler, 2017 ; Cavuzic, 2017 ; Chatterjee, 2022].

C'est notamment le cas de la sulfurtransférase humaine à domaine rhodanèse MOCS3, qui peut capter un persulfure généré par la MPST (**Figure 21B**) [Pedre, 2021], et de son homologue chez la levure, Uba4, qui reçoit un persulfure via un relais de transfert de soufre initié par la cystéine désulfurase Nfs1 [Termathe, 2018]. Ces deux enzymes utilisent un mécanisme similaire pour catalyser la formation d'un thiocarboxylate sur la glycine C-terminale de la protéine de type ubiquitine Urm1. Selon le mécanisme proposé pour Uba4 (**Figure 22**), le résidu carboxy-terminal d'Urm1 est activé par adénylylation. Une cystéine d'Uba4 attaque ensuite la protéine adénylylée, formant un thioester entre Urm1 et Uba4. Ce thioester est alors attaqué par le persulfure de la cystéine rhodanèse d'Uba4, aboutissant à un persulfure d'acyle intermoléculaire avec Urm1. Ce dernier est enfin réduit pour produire le thiocarboxylate à l'extrémité d'Urm1 [Termathe, 2018]. Le thiocarboxylate d'Urm1 sert notamment de donneur de soufre terminal pour la synthèse du nucléoside  $s^2U34$  de l'ARNt cytosolique chez les eucaryotes, catalysée par les sulfurtransférases Ncs6/Ncs2 [Pedrioli, 2008].

Un mécanisme analogue a été décrit chez la bactérie *Thermus thermophilus*, avec la protéine de type ubiquitine TtuB qui fournit un atome de soufre via son thiocarboxylate C-terminal à la sulfurtransférase TtuA pour la synthèse du nucléoside thiolé  $s^2T54$  de l'ARNt [Chen, 2020]. Il a été observé *in vivo* que l'inactivation du gène *ttuB* mène à des souches mutantes de *T. thermophilus* dépourvues du nucléoside  $s^2T$  [Shigi, 2006]. L'activité enzymatique de TtuA nécessite un cluster fer-soufre (Cf. Introduction IV), qui facilite le transfert de soufre du thiocarboxylate de TtuB au nucléoside T54 de l'ARNt. Cette hypothèse a été avancée à la suite d'expériences d'activité catalytique et de spectroscopie EPR impliquant les deux protéines, ainsi que de l'obtention d'une structure du complexe TtTtuA-TtTtuB montrant le thiocarboxylate de TtuB à proximité de l'atome de fer non lié à la protéine du cluster [4Fe-4S] (**Figure 23**) [Chen, 2020].



**Figure 22 : Mécanisme proposé pour la thiocarboxylation de Urm1 par la sulfurtransférase Uba4** [Termaat, 2018]. Un persulfure est généré sur la cystéine du domaine rhodanèse (RHD) à partir de la cystéine (in vivo) ou du thiosulfate (in vitro) (étape 1). Urm1 est adénylée à son extrémité C-terminale par Uba4 (étape 2), puis une liaison thioester intermoléculaire est formée avec la cystéine du domaine de type E1 (étape 3). Cet intermédiaire thioester est ensuite attaqué par le persulfure de Uba4, formant un persulfure d'acyle intermoléculaire entre la cystéine du domaine rhodanèse de Uba4 et Urm1 (étape 4). La réduction du persulfure d'acyle libère Urm1 thiocarboxylée et régénère Uba4 (étape 5).



**Figure 23 : Site actif de la structure cristallographique du complexe TtuA-TtuB de *T. thermophilus*** [Chen, 2020]. TtuB forme un intermédiaire avec le cluster [4Fe-4S] via son groupe thiocarboxylate C-terminal. Les tests d'activité catalytique impliquant les deux protéines, ainsi que les études de mutagenèse dirigée, révèlent que le transfert du soufre du thiocarboxylate de TtuB au cluster [4Fe-4S] est conditionné par l'adénylation de l'ARNt substrat et que la lysine137 est essentielle pour la désulfuration de TtuB.



### **III.2. Une mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation d'un cluster [4Fe-4S] ?**

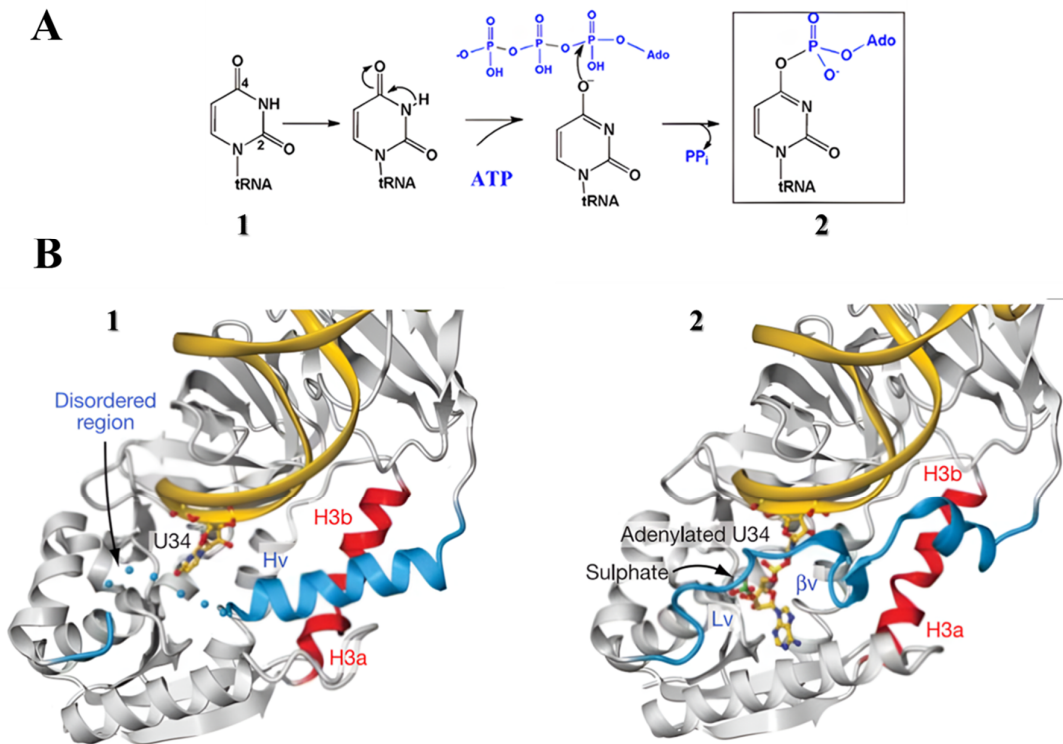
Étant donné l'importance cruciale des cystéines désulfurases dans le métabolisme du soufre chez les divers règnes du vivant, il est surprenant de constater que plusieurs archées, notamment des *Methanococcales* et d'autres méthanogènes, ne possèdent pas de gènes codant pour des enzymes homologues aux cystéines désulfurases IscS, NifS et SufS [Kotera, 2010 ; Liu, 2012 ; Garcia, 2022]. Cela interpelle sur les stratégies alternatives employées par ces organismes pour la mobilisation du soufre en l'absence de ces enzymes clés [Black, 2015]. Des études phylogénétiques ont mis en évidence que certains de ces organismes ont une cystéine désulfidase CyuA. La caractérisation biochimique de CyuA de l'archée *M. jannaschii* a montré que l'enzyme catalyse la désulfuration la L-cystéine à l'aide d'un cluster catalytique [4Fe-4S] [Tchong, 2005]. Il a ainsi été proposé que cette enzyme assure la fonction de mobilisation du soufre normalement attribuée aux désulfurases, absentes chez ces organismes [Tchong, 2005]. Afin de tester cette hypothèse, le premier projet de cette thèse vise la caractérisation biochimique, structurale et fonctionnelle d'une de ces cystéines désulfidases (MmCyuA). Ce travail s'intègre donc dans l'étude d'une enzyme potentiellement impliquée dans la mobilisation du soufre (Cf. Projet 1).



## IV. Mécanismes enzymatiques d'insertion du soufre dans les biomolécules

La mobilisation enzymatique du soufre sous forme de persulfure, initiée principalement par les cystéine désulfurases, permet son transfert direct, ou via un relais protéique, vers différentes enzymes de thiolation qui l'incorporent dans une variété de composés soufrés (**Figure 19**). Pour effectuer cette réaction, ces enzymes de thiolation utilisent des intermédiaires persulfures, thiocarboxylates, des clusters [Fe-S] de façon redox ou non, ou le « sacrifice » d'un groupement thiol d'un résidu cystéine de l'enzyme — ce dernier mécanisme étant indépendant de toute mobilisation préalable du soufre. En lien avec le projet numéro 2, l'objectif est de présenter ici certains de ces mécanismes et les enzymes qui leur sont associées.

De manière générale, le processus de thiolation débute par l'activation du substrat, facilitant ainsi l'incorporation subséquente d'un atome de soufre transféré de l'enzyme au substrat [Chatterjee, 2022]. Les enzymes de thiolation se distinguent par leurs stratégies d'activation et d'incorporation spécifiques du soufre. Par exemple, les enzymes de thiolation non-redox qui appartiennent à la famille des ATP pyrophosphatases (Cf sections IV.1 et IV.3.1), utilisent l'ATP pour activer leur substrat via adénylation (**Figure 24**). L'existence de l'intermédiaire adénylate a été montrée expérimentalement chez les enzymes de thiolation de l'ARNt, notamment dans la structure cristalline du complexe de la sulfurtransférase MnmA d'*E. coli* liée à l'ARNt (**Figure 24**) [Numata, 2006], et pour l'enzyme ThiI d'*E. coli* par LC-ESI-MS [You, 2008]. D'autre part, les enzymes de thiolation appartenant à la superfamille des radical-SAM (voir section IV.3.2) génèrent un radical 5'-désoxyadénosyl à partir du cofacteur SAM. Ce radical 5'-désoxyadénosyl initie ensuite l'activation du substrat en générant un radical sur ce dernier [Lieder, 1998 ; McLaughlin, 2016].



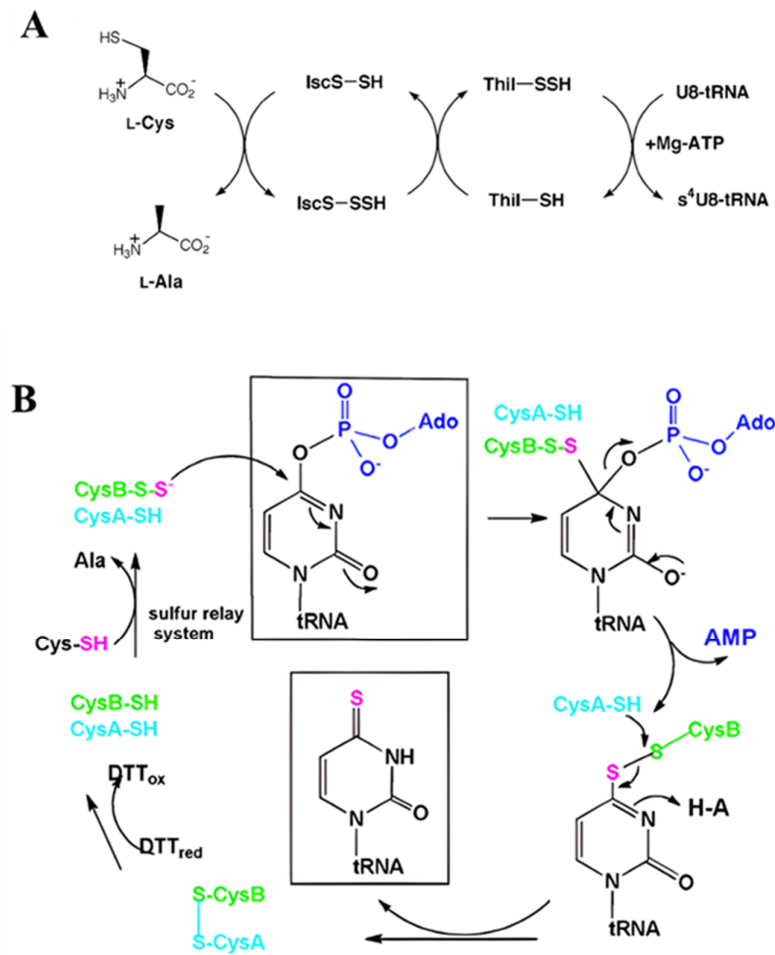
**Figure 24 : Activation de l'uridine 34 par adénylation en vue de l'insertion subséquente d'un atome de soufre par la sulfurtransférase MnmA d'*E. coli*, appartenant à la famille des ATP pyrophosphatases.**

- (A) Mécanisme proposé pour l'adénylation de l'uridine (1) par utilisation d'ATP afin de former un intermédiaire adénylé (2) [Bimai, 2020].
- (B) Structures cristallographiques de MnmA d'*E. coli* à deux états réactionnels : (1) état initial de liaison avec l'ARNt ; (2) état intermédiaire avec l'uridine adénylée. La formation de l'intermédiaire entraîne la stabilisation d'une boucle mobile du site actif (colorée en bleu) [Numata, 2006].

#### **IV.1. Insertion du soufre impliquant l'utilisation d'intermédiaires persulfures par des enzymes de la superfamille des rhodanèses**

Plusieurs enzymes de thiolation possédant un domaine rhodanèse utilisent un persulfure comme source de soufre pour catalyser la sulfuration de diverses biomolécules soufrées (**Figure 19**) [Leimkühler, 2017 ; Chatterjee, 2022 ; Alsohaibani, 2023]. Cela est notamment le cas pour former les thionucléosides de l'ARNt, tels que le s<sup>4</sup>U ou la 6-thioguanosine, catalysés respectivement par les enzymes de modification TtuI (nommée également ThiI) d'*E. coli* (**Figure 19**) et YcfA d'*Erwinia amylovora* [Lauhon, 2000 ; Coyne, 2013]. Le persulfure utilisé par TtuI provient de la cystéine désulfurase IscS (**Figure 25A**) [Lauhon, 2000]. Chez *Chlorobium limicola*, lors de la synthèse de l'ergothionéine, un acide aminé dérivé de l'histidine, un persulfure formé *in vitro* à partir de polysulfures sur le domaine rhodanèse de la sulfurtransférase EanB est utilisé pour catalyser l'insertion du soufre dans le composé [Cordell, 2022]. De plus, des tests d'activité *in vitro* de la protéine à domaine rhodanèse humaine TSTD1 suggèrent qu'elle pourrait également transférer son persulfure, formé à partir de thiosulfate, au glutathion ou à la thioredoxine humaine [Melideo, 2014 ; Libiad, 2018 ; Alsohaibani, 2023].

Le mécanisme suggéré pour la thiolation des nucléosides modifiés s<sup>4</sup>U8 par l'enzyme TtuI de *E. coli* [Mueller, 2001] fait intervenir deux cystéines catalytiques. Celle du domaine rhodanèse porte un persulfure sur sa cystéine conservée qui fait une attaque nucléophile sur la position cible activée du substrat, formant ainsi une liaison covalente C-S et libérant de l'AMP (**Figure 25B**) [Mueller, 2001]. La deuxième cystéine catalytique servirait à couper le pont disulfure entre l'enzyme et le nucléoside, permettant de libérer le nucléoside thiolé. Enfin, la réduction de ce pont disulfure par un réducteur non identifié *in vivo*, ou le DTT *in vitro*, permettrait de régénérer les cystéines catalytiques pour un nouveau cycle réactionnel.



**Figure 25 : Sulfuration du C4 du nucléoside U8 de l'ARNt de *E. coli* par l'enzyme de modification TtuI (ThiI) via l'utilisation d'un persulfure**

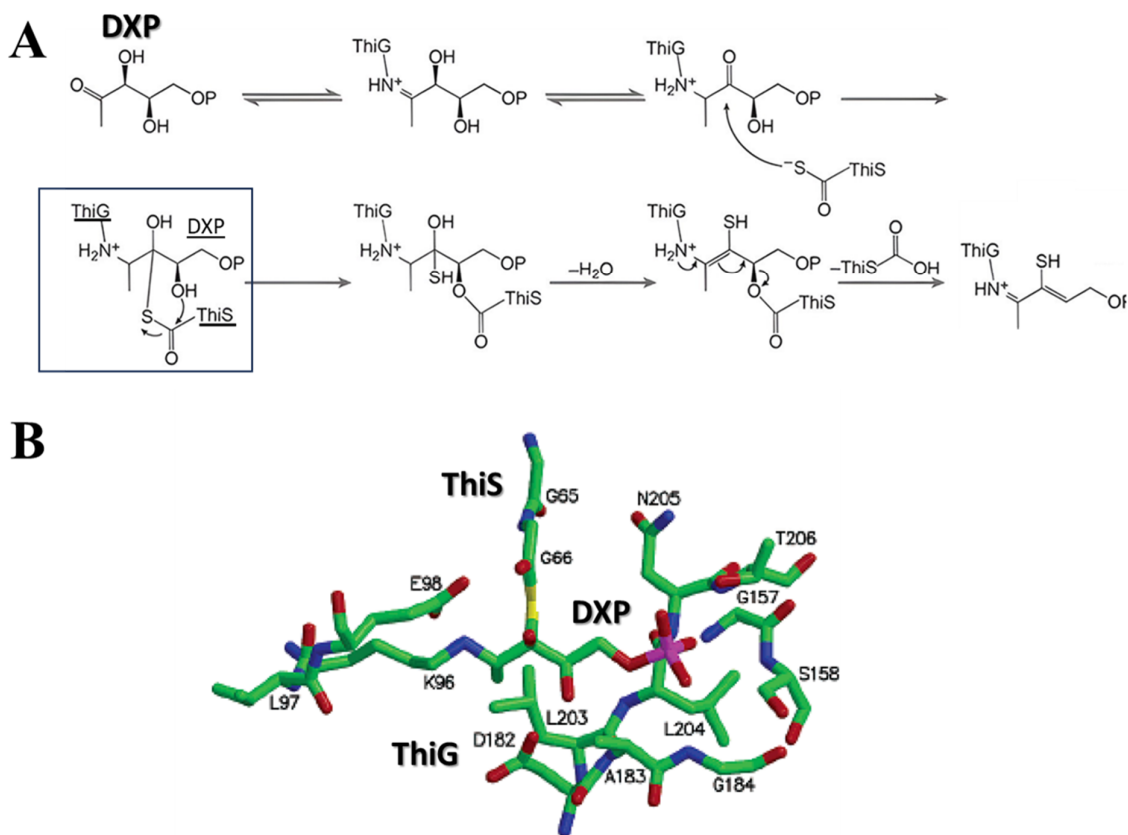
**(A).** Mobilisation et transfert du soufre de la L-cystéine à TtuI par la cystéine désulfurase IscS chez *E. coli* [Lauhon, 2000].

**(B)** Mécanisme catalytique proposé pour la sulfuration du nucléoside U8 par TtuI : Attaque nucléophile de l'uridine activée par le soufre terminal du persulfure porté par une des deux cystéines catalytiques. Puis coupure du pont disulfure intermoléculaire entre l'enzyme et l'ARNt par la seconde cystéine catalytique, conduisant à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines. Une réduction finale du pont disulfure régénère les cystéines catalytiques [Bimai, 2020].

## IV.2. Insertion enzymatique du soufre impliquant un intermédiaire thiocarboxylate

Le groupement thiocarboxylate, en plus de sa capacité à fournir du soufre aux sulfurtransférases pour que celles-ci l'insèrent dans diverses molécules (Cf. section III.1.3), peut aussi être utilisé pour catalyser directement l'insertion de soufre dans la synthèse de composés comme la thiamine [Jurgenson, 2009] et le cofacteur molybdène (Moco) (**Figure 19**) [Mayr, 2021].

Dans la voie de biosynthèse du Moco chez les eucaryotes, un thiocarboxylate est initialement formé sur la sulfurtransférase MOCS2A à partir d'un relais protéique initié par la cystéine désulfurase NifS [Leimkühler, 2017 ; Mayr, 2021]. Ensuite, en association avec MOCS2B, qui est une protéine se liant à un précurseur du Moco, MOCS2A catalyse l'insertion de soufre dans ce précurseur en utilisant son thiocarboxylate terminal [Leimkühler, 2017 ; Mayr, 2021]. De même, durant la biosynthèse de la thiamine chez *E. coli*, le soufre est initialement mobilisé par la cystéine désulfurase IscS, puis transféré à la sulfurtransférase ThiI. Cette enzyme forme un thiocarboxylate à l'extrémité terminale de ThiS (**Figure 19**). Le groupe thiocarboxylate ainsi formé, avec l'assistance de la thiazole synthase ThiG, catalyse l'insertion du soufre dans le substrat pour synthétiser le phosphate de thiazole, un précurseur clé de cette voie métabolique (**Figure 26**) [Jurgenson, 2009 ; Leimkühler, 2017].



**Figure 26 : Sulfuration du 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) via le thiocarboxylate de ThiS dans le cadre de la biosynthèse de la thiamine chez *E. coli*.**

**(A) Mécanisme catalytique proposé pour la sulfuration du DXP par ThiS de *E. coli*** [Jurgenson, 2009]. Le DXP est initialement activé par la thiazole synthase ThiG, permettant l'attaque nucléophile du substrat par l'atome de soufre du thiocarboxyle terminal de ThiS. L'intermédiaire catalytique ainsi formé, souligné sur le schéma, est représenté par le modèle structural en (B). Un groupement hydroxyle du DXP réalise ensuite une attaque nucléophile sur le groupement cétone terminal de ThiS, facilitant le départ du soufre vers le DXP pour former le thiazole phosphate. Ce dernier est ensuite utilisé en aval dans la voie métabolique pour générer la thiamine.

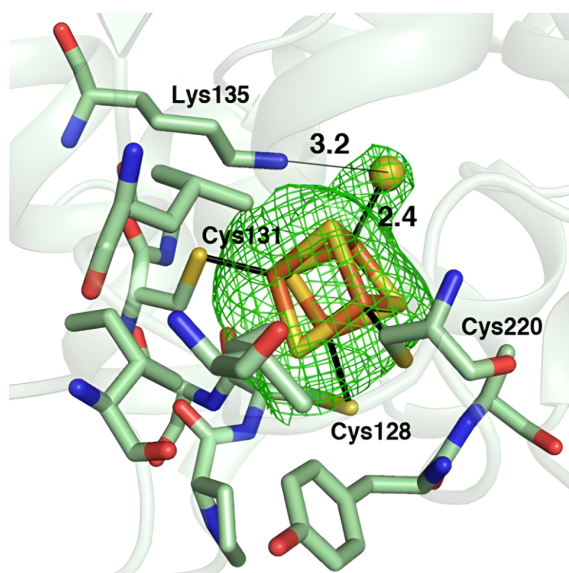
**(B) Modèle du DXP lié au complexe ThiG/ThiS**, élaboré à partir de la structure cristallographique du complexe [Settembre, 2004]. Ce modèle illustre l'intermédiaire catalytique mis en évidence dans le mécanisme réactionnel proposé en (A).



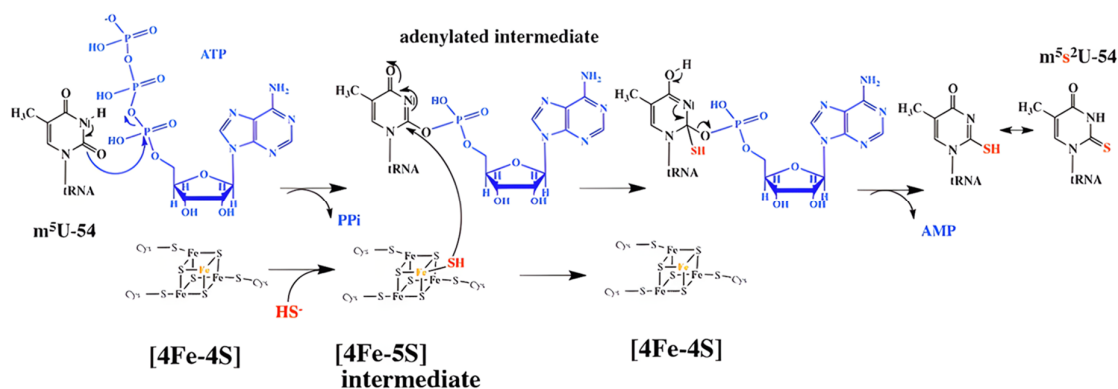
### IV.3. Insertion enzymatique du soufre impliquant l'utilisation d'un cofacteur [Fe-S]

#### IV.3.1. Catalyse non-redox de l'insertion du soufre via des clusters [4Fe-4S]

Les clusters [4Fe-4S] peuvent servir de cofacteur dans des réactions non redox, jouant le rôle d'acide de Lewis [Flint, 1996], en particulier dans certaines réactions de sulfuration (**Figure 19**). Le mécanisme réactionnel a été principalement caractérisé chez des enzymes impliquées dans la synthèse des thionucléosides de l'ARNt, telles que l'enzyme TtuA qui catalyse la formation de m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U54 chez *T. thermophilus* et *P. horikoshii* [Chen, 2017 ; Chen, 2020 ; Arragain, 2017], MnmA pour x<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34 chez *E. coli* [Zhou, 2021] et chez *T. thermophilus* [Shigi, 2020], TtuI pour s<sup>4</sup>U8 chez *M. maripaludis* [He, 2022], ainsi que NcsA pour x<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34 chez *M. maripaludis* [Bimai, 2023] (**Figure 19**). Les premières structures cristallographiques d'enzymes catalysant l'insertion d'un soufre dans un nucléoside à l'aide d'un cluster [4Fe-4S] ont été celles de TtuA qui catalyse la formation de m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U54 [Chen, 2017 ; Arragain, 2017]. Les structures de l'holoenzyme PhTtuA en complexe avec un analogue de l'ATP [Chen, 2017] et TtTtuA avec de l'AMP [Arragain, 2017] ont montré que le cluster [4Fe-4S] est coordonné par trois cystéines (**Figure 27**). Ces structures révèlent également que le nucléotide se positionne à proximité du cluster dans les deux orthologues. De plus, dans la structure de PhTtuA, une densité électronique est observée en face de l'atome de fer du cluster [4Fe-4S] qui n'est pas lié à la protéine, ce qui suggère une forte propension de cet atome à coordonner un élément exogène (**Figure 27**). Tandis qu'il a été proposé que PhTtuA utilise le sulfure inorganique comme source de soufre, abondant dans l'environnement de cette archée [Arragain, 2017], le soufre chez TtTtuA est fourni par le groupe thiocarboxylate terminal de la protéine partenaire TtuB (Cf. section II.1.3) [Chen, 2020]. Pour toutes les enzymes de thiolation des ARNt, trois atomes de fer du cluster sont liés à des résidus cystéine/aspartate de la protéine, tandis que le quatrième atome de fer, non lié à la protéine, coordonne le soufre de la source de soufre (sulfure exogène, thiocarboxylate, ...) qui est ensuite inséré dans le substrat [Bimai, 2020]. Le quatrième atome de fer du cluster [4Fe-4S], non lié à la protéine, se lie au soufre du substrat (par exemple du sulfure inorganique), formant ainsi un intermédiaire [4Fe-5S] (**Figure 28**). Le groupe SH de cet intermédiaire agit ensuite comme nucléophile pour catalyser la substitution non-redox d'un atome d'oxygène par un atome de soufre sur le nucléoside adénylé [Zhou, 2022].



**Figure 27 :** Site actif de l'enzyme PhTtuA de *Pyrococcus horikoshii* [Arragain, 2017]. Le cluster [4Fe-4S] est coordonné par trois résidus de cystéine. Une densité électronique supplémentaire est visible en face de l'atome de fer du cluster qui n'est pas lié à la protéine, attribuée à un soufre. La carte de densité électronique Fo-Fc, omettant le cluster [4Fe-4S], est superposée au site actif de PhTtuA et contournée à  $2\sigma$ .



**Figure 28 :** Mécanisme catalytique proposé pour la sulfuration du nucléoside U54 de l'ARNt de *P. horikoshii* par l'enzyme de modification TtuA via l'utilisation d'un cluster [4Fe-4S] [Bimai, 2020]

Le cluster [4Fe-4S] agit comme un transporteur de soufre, formant temporairement un intermédiaire [4Fe-5S]. L'uridine  $m^5U54$  est d'abord activée par adénylation. Ensuite, l'hydrogénosulfure issu de l'intermédiaire [4Fe-5S] réalise une attaque nucléophile sur l'intermédiaire adénylé, menant à la formation du produit final  $m^5s^2U54$ .

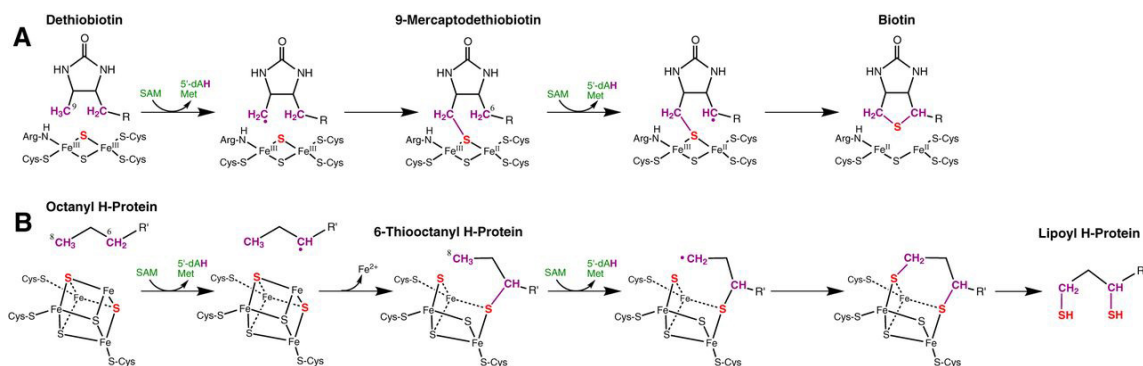
### IV.3.2. Catalyse radicalaire de l'insertion de soufre via des clusters [Fe-S]

Certaines enzymes de la superfamille des radical-SAM utilisent le cluster [Fe-S] comme une source de soufre pour catalyser l'insertion d'un atome de soufre selon un mécanisme radicalaire qui fait intervenir le cofacteur S-adénylméthionine (SAM) (**Figure 29**) [Fugate, 2012 ; Lanz, 2012 ; Jarrett, 2015 ; Chatterjee, 2022 ; Booker, 2023].

Ce mécanisme sacrificiel est notamment utilisé par la biotine synthase BioB, pour insérer un atome de soufre sur la déthiobiotine durant la biosynthèse de la biotine (**Figure 29A**) [Fugate, 2012 ; Jarrett, 2015]. BioB contient deux clusters [4Fe-4S] et [2Fe-2S]. Selon le mécanisme proposé, le cluster [4Fe-4S] lie et accepte un électron du cofacteur SAM, facilitant ainsi son clivage réducteur pour générer un radical 5'-désoxyadényl, qui réalise l'extraction radicalaire d'un atome d'hydrogène du carbone cible du substrat. Ce carbone, sur lequel un nouveau radical est formé, se lie alors à un atome de soufre du cluster auxiliaire [2Fe-2S]. La génération d'un second radical sur un deuxième carbone du substrat, via un nouveau cycle de clivage de la SAM, permet de finaliser l'incorporation du soufre du cluster au substrat, menant à la production du cofacteur biotine [Fugate, 2012 ; Jarrett, 2015].

Un mécanisme similaire a été proposé pour la lipoate synthase LipA, impliquée dans l'insertion de deux atomes de soufre sur une chaîne octanoyle liée à une protéine durant la synthèse de l'acide lipoïque (**Figure 29B**) [Lanz, 2012 ; Jarrett, 2015 ; McLaughlin, 2016]. Cette enzyme se caractérise par la présence de deux clusters [4Fe-4S] : l'un assure la liaison séquentielle et le clivage réducteur de deux molécules de SAM, tandis que l'autre fournit les deux atomes de soufre nécessaires à la réaction (**Figure 30**). Le mécanisme de la réaction est similaire à celui de BioB.

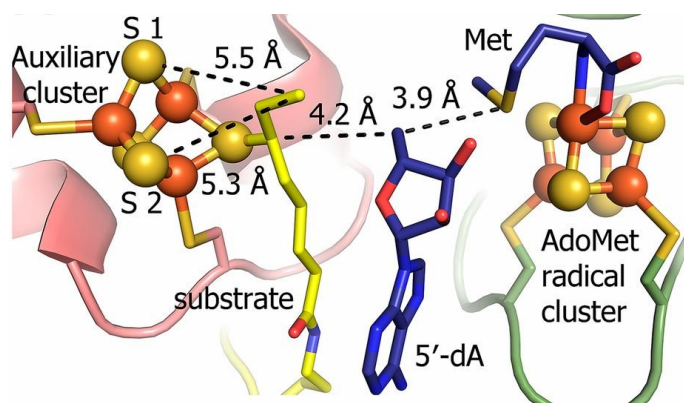
Dans les deux cas cités, la libération du produit s'accompagne de la dégradation du cluster [Fe-S] qui fournit le soufre, ce qui implique que ces réactions sont limitées à un unique cycle catalytique si le cluster n'est pas régénéré [Jarrett, 2015]. Pour la biotine synthase BioB, il a été montré que les cystéine désulfurases NifS et IscS peuvent stimuler son activité enzymatique *in vitro* en fournissant du soufre nécessaire à la reconstitution de son cluster [Fe-S] [Kiyasu, 2000]. Concernant LipA, l'ajout dans le mélange réactionnel de la cystéine désulfurase IscS et des protéines échafaudages NfuA et IscU, impliquées dans la biosynthèse des clusters [Fe-S] (cf. Introduction II), favorise la régénération du cluster enzymatique *in vitro* après chaque cycle catalytique [McCarthy, 2017].



**Figure 29 : Mécanisme catalytique proposé pour la sulfuration de la déthiobiotine et d'une chaîne octanoyle par les enzymes radical-SAM BioB et LipA, impliquées respectivement dans la biosynthèse de la biotine et de l'acide lipoïque [Jarrett, 2015]. Ces deux enzymes contiennent également un cluster [4Fe-4S] fixé par trois résidus cystéine qui coordonnent la SAM.**

(A) Le mécanisme pour la biotine synthase BioB implique initialement la formation d'un radical sur la déthiobiotinyle par le cluster  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ , conduisant à la formation d'un intermédiaire 9-MDTB lié à un atome de soufre du cluster  $[2\text{Fe}-\text{S}-\text{R}]^+$ . La formation d'un second radical sur le 9-MDTB facilite ensuite le départ de ce soufre vers celui-ci complétant ainsi la synthèse de la biotine.

(B) Pour la lipoyl synthase LipA, le mécanisme débute par la formation d'un radical sur la chaîne octanoyle par le cluster  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ , formant un intermédiaire  $[3\text{Fe}-3\text{S}-\text{R}]^+$  avec un atome de soufre du cluster lié au substrat. La formation d'un second radical sur la chaîne octanoyle facilite l'introduction d'un deuxième atome de soufre du cluster  $[3\text{Fe}-3\text{S}-\text{R}]^+$  vers celle-ci, menant à la synthèse de la forme lipoylée finale et à la dissociation du cluster  $[\text{FeS}]$ .



**Figure 30 : Site actif de la structure cristallographique de LipA en complexe avec l'intermédiaire catalytique lié au cluster  $[\text{Fe-S}]$  auxiliaire [McLaughlin, 2016]. Le substrat peptide octanoyl-H est représenté en jaune, tandis que le 5'-dA et la méthionine sont en bleu foncé. Les distances entre le C5' du 5'-dA et ses partenaires réactionnels, ainsi qu'entre le C8 du substrat octanoyl et ses partenaires réactionnels potentiels sont indiquées.**

#### **IV.4. Insertion enzymatique du soufre impliquant un résidu sacrificiel**

Le dernier mécanisme de sulfuration concerne les enzymes qui catalysent le transfert d'un atome de soufre depuis le groupement thiol d'un de leurs résidus cystéine pour l'insérer dans leur substrat. Les deux cas mentionnés ci-dessous seront développés plus en détail dans le cadre du projet 2 de cette thèse.

Le premier cas concerne la sulfuration catalysée par la thiamine thiazole synthase au cours de la biosynthèse de la thiamine chez les eucaryotes. Alors que la thiamine thiazole synthase bactérienne utilise un thiocarboxylate comme source de soufre (Cf. section IV.2) [Jurgenson, 2009], son orthologue eucaryote THI4p utilise le groupement thiol d'une cystéine conservée [Chatterjee, 2011]. Selon le mécanisme proposé, ce transfert de soufre est facilité par un ion  $Fe^{2+}$  et s'accompagne de la formation d'un résidu déshydroalanine [Chatterjee, 2011]. À ce jour, aucun système de régénération du résidu de cystéine catalytique n'a été identifié, ce qui rend le mécanisme sacrificiel [Chatterjee, 2011 ; Eser, 2016].

Le deuxième cas concerne la sulfurtransférase LarE de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum*, qui catalyse l'insertion de soufre dans un cofacteur crucial pour la racémisation du lactate.



## **Projet 1 : La cystéine désulfidase CyuA de *M. maripaludis*, une mobilisation enzymatique du soufre via l'utilisation d'un cluster [Fe-S] ?**

Ce premier projet se concentre sur CyuA, une cystéine désulfidase dépendante d'un cluster [4Fe-4S]. Tel qu'évoqué dans la section III de l'introduction, l'étude biochimique et structurale de cette enzyme vise à élucider un mécanisme enzymatique jusqu'alors peu connu pour une réaction de désulfuration [Zhou, 2022]. La caractérisation fonctionnelle de la cystéine désulfidase de l'archée *M. maripaludis* pourrait également donner des indications quant à son implication dans la mobilisation du soufre chez cet organisme. Enfin, les résultats obtenus seront mis en perspective avec les caractérisations fonctionnelles réalisées sur différents orthologues de CyuA.

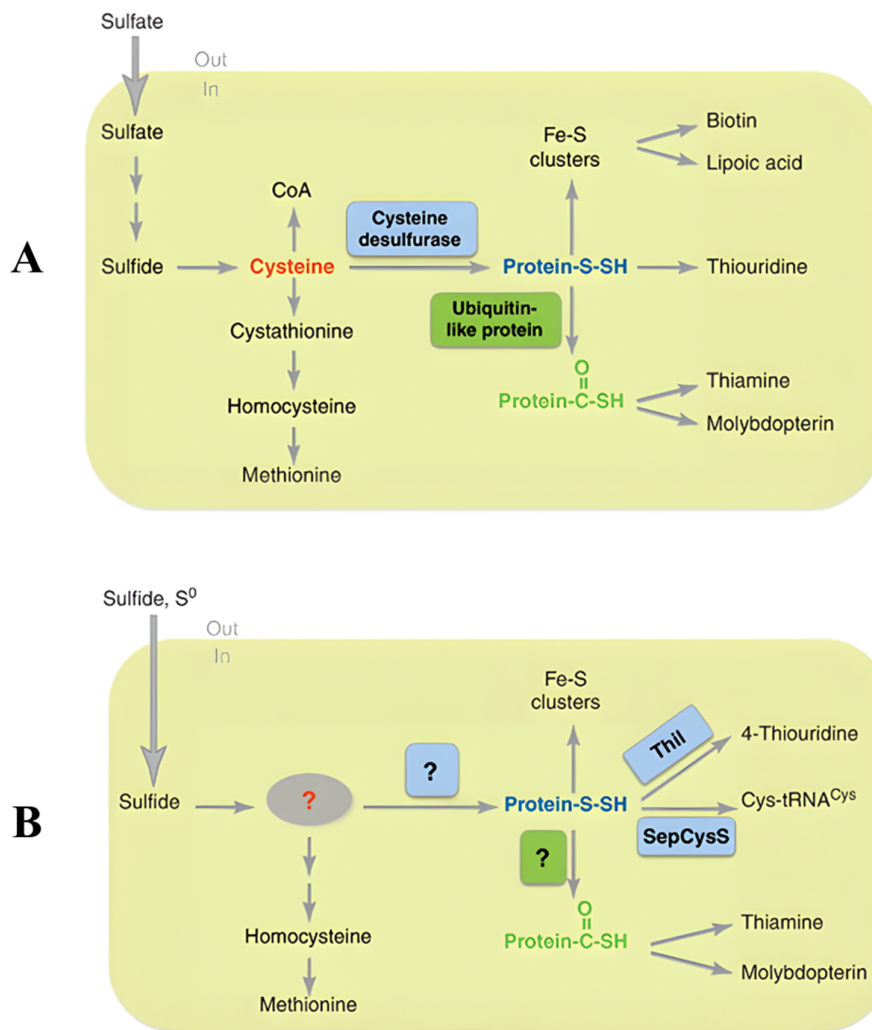
## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Genèse



## I. Genèse du projet

Comme décrit dans la section III de l'introduction, la mobilisation enzymatique du soufre à partir d'une forme stable, telle que la cystéine, offre de nombreux avantages pour la cellule (**Figure 31A**) [Black, 2015 ; Leimkuehler, 2017]. Étant donné le rôle essentiel des cystéines désulfurases dans ce processus, il est surprenant que plusieurs archées, notamment des espèces du genre *Methanococcus* et d'autres méthanogènes, ne disposent pas de gènes codant pour des cystéines désulfurases telles que ISC, NIF ou SUF (**Figure 31B**) [Liu, 2012 ; Kotera, 2010].

En 2003, des expériences ont été menées pour caractériser les voies de biosynthèse de la cystéine chez l'archée méthanogène *M. jannaschii*, un organisme dépourvu de cystéine désulfurase [White, 2003]. L'ajout de cystéine au lysat cellulaire entraînait une augmentation de la production de sulfure en condition anaérobie, mesurée via un dosage au bleu de méthylène [Fogo, 1949], ainsi qu'une augmentation du pyruvate, mesurée par GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry), suggérant l'existence d'une activité enzymatique de désulfuration de la cystéine chez cet organisme [White, 2003]. La fraction active, purifiée à partir du lysat, présentait une absorbance à 405 nm caractéristique d'un cluster fer-soufre et était capable de produire du sulfure à partir de la cystéine exclusivement en anaérobie (**Figure 32**). En outre, aucune trace de cofacteur PLP n'était détectée dans cette fraction, et l'ajout d'EDTA au milieu réactionnel provoquait une diminution de l'activité enzymatique de 70 %. L'enzyme à l'origine de cette activité a été isolée, séquencée et renommée L-cystéine désulfidase (MjCyuA).



**Figure 31 : Schéma de l'assimilation du soufre chez *E. coli* (A) et chez les archées de l'ordre des *Méthanococcales* (B), soulignant les différences dans la caractérisation des systèmes d'assimilation de ces deux organismes [Liu, 2012].**

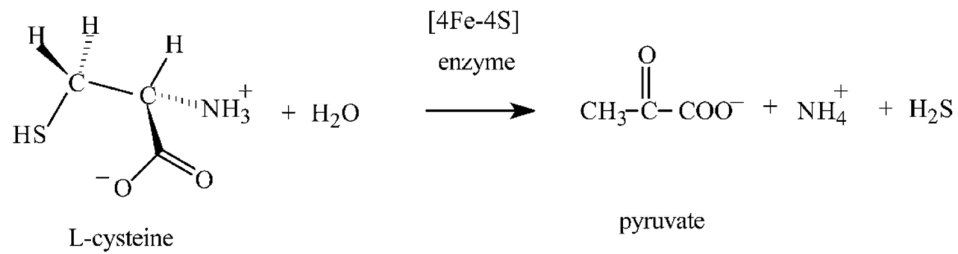
- (A) Chez *E. coli*, le soufre est assimilé sous forme de cystéine, puis redistribué par la cystéine désulfurase sous forme de persulfure pour la biosynthèse de molécules soufrées, telles que les clusters [Fe-S], des nucléosides thiolés et d'autres cofacteurs (cf. Introduction III). Pour la synthèse de la cystéine chez cet organisme, voir Introduction I.
- (B) Chez les archées *Méthanococcales*, l'assimilation du soufre reste mal comprise. À ce jour, ni le donneur de soufre pour la biosynthèse de molécules soufrées, ni les mécanismes de mobilisation du soufre n'ont été clairement élucidés. Il est supposé qu'une enzyme, analogue à la cystéine désulfurase, pourrait catalyser la mobilisation du soufre à partir de la cystéine, mais aucune protéine n'a été spécifiquement identifiée pour cette fonction.

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Genèse

L'analyse de l'alignement de séquences de différentes cystéine desulfidases a montré qu'elles possèdent quatre cystéines conservées, potentiellement impliquées dans la liaison d'un cluster [4Fe-4S] catalytique [Tchong, 2005 ; Mendez, 2011 ; Loddeke, 2017].

Lors de la caractérisation de MjCyuA, la protéine recombinante a été purifiée en conditions aérobies [Tchong, 2005]. La fraction résultante contenait 2,7 mol de Fe par sous-unité et présentait un spectre d'absorbance avec des pics à 365 et 425 nm, typiques d'un cluster [3Fe-4S] [Tchong, 2005]. Il est possible que ce cluster [3Fe-4S] corresponde à un produit de dégradation d'un cluster [4Fe-4S] (Cf. Introduction, section II.). D'autant plus que la fraction de CyuA extraite du lysat cellulaire devenait inactive en conditions aérobies [White, 2003]. C'est pourquoi, lors de la caractérisation enzymatique de MjCyuA recombinante, le mélange réactionnel contenant le substrat cystéine a été supplémenté avec des ions ferreux et un réducteur (DTT). Ce mélange, placé dans une fiole scellée dans conditions anaérobies, visait à restaurer l'activité de l'enzyme en reconstituant le cluster [4Fe-4S], comme cela avait été constaté pour d'autres enzymes, comme l'aconitase [Beinert, 1983]. Les niveaux de production de sulfure par l'enzyme, dans ces conditions, étaient comparables à ceux de la fraction extraite du lysat cellulaire en anaérobie. Les constantes catalytiques de MjCyuA pour la cystéine ont été déterminées avec un  $K_m$  de  $1,78 \pm 0,14$  mM et un  $k_{cat}$  de  $39,6$  s<sup>-1</sup>. Des tests ont été effectués avec d'autres substrats potentiels, et seules la D-cystéine et la D/L-selenocystéine ont généré une activité enzymatique, bien qu'inférieure à celle de la L-cystéine. Une analyse par GC-MS a confirmé que seul du pyruvate était produit à partir de la cystéine, excluant ainsi la formation d'alanine ou de sérine.

En l'absence d'une structure de MjCyuA, les quatre cystéines conservées ont été mutées et l'activité des mutants déterminée (**Tableau 3**). Le mutant Cys25Ala est quasiment inactif tandis que les autres mutants C329S, C322S et C282A ont une faible activité enzymatique. L'incubation de l'enzyme avec du N-éthylmaléimide (NEM) ou de l'iodoacétamide (IAA), deux agents alkylants, inhibe l'activité enzymatique et l'analyse par spectrométrie de masse de l'enzyme inactivée par le NEM montre que le site d'alkylation correspond à la cystéine 25. Ces résultats suggèrent donc que la Cys25 joue un rôle catalytique, et que les trois autres cystéines Cys329, Cys322 et Cys282 sont impliquées dans la liaison du cluster [4Fe-4S] (**Figure 33**).



**Figure 32** : Réaction de désulfuration de la L-cystéine catalysée par la cystéine désulfidase (MjCyuA) [Tchong, 2005].

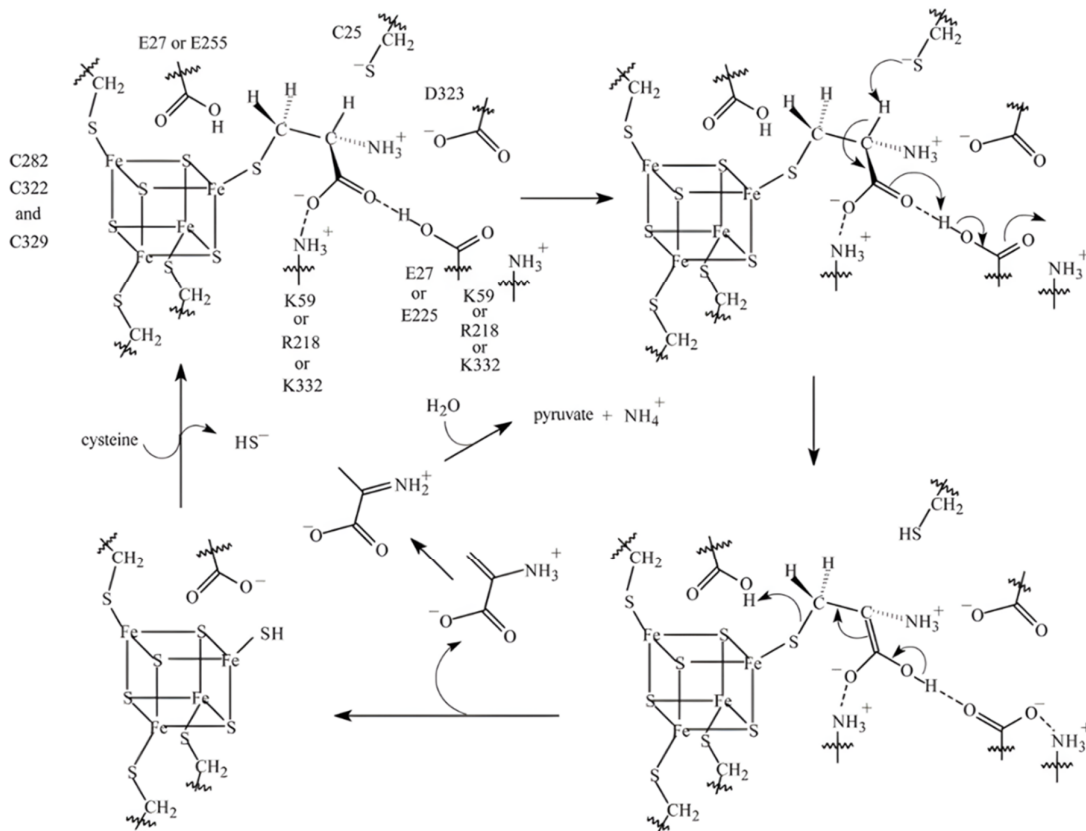
**Tableau 3** : Activité spécifique de MjCyuA selon le résidu conservé muté, soit en alanine (A), en serine (S) ou en asparagine (N) [Tchong, 2005].

mutant	specific activity <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}$ of sulfide $\text{min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}$ of protein)
wild-type MJ1025	55.8
C329S	6.8
C322S	6.5
C282A	2.8
C25A	0.22
C322A and C329A	0.00
H139N	49
D323N	30

Une analyse par GC-MS de la L-cystéine après incubation avec MjCyuA dans de l'eau deutérée a montré que l'enzyme catalyse l'échange de l'hydrogène C-2 de la L-cystéine avec le solvant [Tchong, 2005]. Le quatrième fer, non lié à la protéine, pourrait lier le groupement thiol du substrat L-cystéine, qui agirait comme acide de Lewis. Une catalyse acide-base concertée impliquerait la Cys25 jouant le rôle de base arrachant l'hydrogène du carbone  $\alpha$  du substrat et l'un des deux résidus glutamate conservés, E27 ou E225, qui agirait comme acide pour protoner le thiol lié au quatrième fer lors du départ du produit aminoacrylate (**Figure 33**). Le 2-aminoacrylate produit réagirait ensuite avec une molécule d'eau pour se décomposer en pyruvate et en ammonium. Pour agir en tant que base, la cystéine C25 devrait être sous forme anionique, ce qui est cohérent avec son interaction précédemment décrite avec le NEM et l'IAA [Tchong, 2005]. D'autres résidus conservés ont également été mutés en alanine mais aucun changement d'activité enzymatique n'a été observée par rapport à l'enzyme sauvage (WT) [Tchong, 2005].

Quant à la fonction de la cystéine désulfidase, la caractérisation biochimique de MjCyuA a mené à l'hypothèse selon laquelle l'enzyme pourrait assurer la mobilisation du soufre à partir de la L-cystéine pour la biosynthèse des clusters [Fe-S], à l'instar des cystéines désulfurases manquantes (Cf. Introduction II.) [Tchong, 2005]. Cette proposition est basée sur le fait que MjCyuA produise du sulfure à partir de la cystéine, tandis que l'archée *M. jannaschii* évolue dans un environnement riche en sulfure [Jones, 1983 ; Tchong, 2005]. Pour ces cellules autotrophes en matière de sulfure, le rôle de CyuA semble davantage lié à une régulation fine du flux de soufre intracellulaire, similaire à celui des cystéines désulfurases (Cf. Introduction III.), plutôt qu'à une simple production de sulfure.

La caractérisation biochimique de MjCyuA a mené à proposer que la fonction de l'enzyme pourrait être d'assurer la mobilisation du soufre à partir de la L-cystéine pour la biosynthèse des clusters [Fe-S], à l'instar des cystéines désulfurases absentes dans *M. jannaschii* (Cf. Introduction III.) [Tchong, 2005]. Cette proposition est basée sur le fait que MjCyuA produise du sulfure à partir de la cystéine [Tchong, 2005], alors que l'environnement de l'archée *M. jannaschii* est riche en sulfure [Jones, 1983 ; Tchong, 2005]. Par conséquent, CyuA pourrait être impliquée dans la régulation du flux de soufre intracellulaire plutôt que dans la production de sulfure.

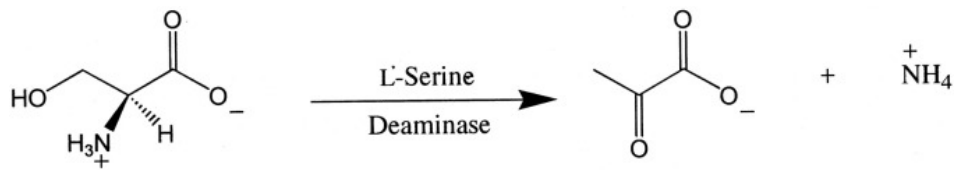


**Figure 33 : Mécanisme catalytique proposé pour la désulfuration de la L-cystéine par MjCyuA, inspiré de celui de l'aconitase [Tchong, 2005]. Les résidus impliqués sont mentionnés sur la base d'expériences de mutagenèse dirigée et de leur niveau de conservation.**

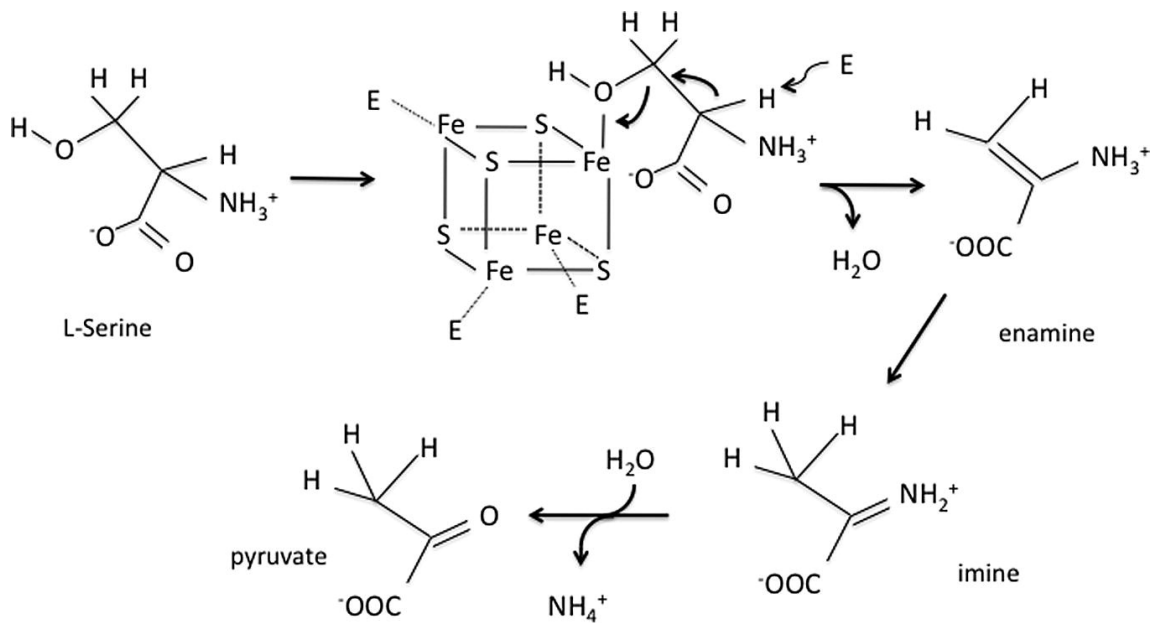
## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Genèse

Le mécanisme réactionnel suggéré pour MjCyuA est inspiré de celui de l'aconitase, bien caractérisé, qui catalyse l'isomérisation réversible du citrate en isocitrate via un métabolite intermédiaire, le cis-aconitate (Cf. Introduction IV) [Lauble, 1992 ; Lloyd, 2008 ; Emptage, 1983]. Or, le mécanisme de l'aconitase sert également de référence au mécanisme proposé pour les L-sérine déshydratases (LSD), qui catalysent la déshydratation de la L-sérine (**Figure 34**) [Cicchillo, 2004 ; Sun, 2005 ; Thoden, 2014]. Il existe deux classes de L-sérine déshydratases (LSD) en fonction de l'utilisation d'un cofacteur PLP ou d'un centre fer-soufre [Sun, 2005 ; Thoden, 2014]. Les LSD qui catalysent la déshydratation de la L-sérine à l'aide d'un cluster [4Fe-4S] catalytique, utilisent un mécanisme similaire aux enzymes CyuA (**Figure 35**) [Cicchillo, 2004 ; Hofmeister, 1994 ; Thoden, 2014]. La déshydratation de la sérine par les LSD et la désulfuration de la cystéine par les CyuA génèrent le même produit final, le 2-aminoacrylate, qui est rapidement transformé en pyruvate et ammoniac (**Figures 33 et 35**).

Outre cette ressemblance au niveau des réactions catalysées, les structures de ces enzymes sont également proches puisque l'homologue structural le plus proche de CyuA répertorié dans la PDB correspond à la L-sérine déshydratase de *L. pneumophila* (LpLSD), avec environ 17% d'identité de séquence (référence 4RQO). Des études de mutagenèse dirigée de LpLSD ont identifié trois résidus cystéines conservés dont la mutation en alanine rendait l'enzyme inactive et entraînait la perte de l'absorbance typique du cluster [4Fe-4S], suggérant leur implication dans la liaison du cluster [Xu, 2011]. Un mécanisme réactionnel a été proposé dans lequel la liaison du cluster [4Fe-4S] à la L-sérine puis la déprotonation du carbone alpha ( $C_\alpha$ ) de la sérine par une base conduit à la formation du produit 2-aminoacrylate (**Figure 35**) [Xu, 2011]. Dans des travaux ultérieurs, la mutation en alanine d'un résidu histidine conservé du site actif de LpLSD ayant entraîné une perte complète de l'activité catalytique, il a été proposé que cette histidine jouerait ce rôle de base catalytique [Thoden, 2014].



**Figure 34** : Réaction déshydratation de la L-sérine catalysée par la sérine déshydratase (LSD) [Cicchillo, 2004]. La réaction produit du 2-aminoacrylate qui évolue vers le pyruvate et un ion ammonium.



**Figure 35** : Mécanisme catalytique proposé pour la déshydratation de la L-sérine par la sérine déshydratase (LSD) utilisant un cluster [4Fe-4S] non redox, inspiré de celui de l'aconitase [Cicchillo, 2004].



## II. Problématique du projet

La première caractérisation de MjCyuA décrite précédemment était préliminaire sous plusieurs aspects. Premièrement, la caractérisation du cluster [4Fe-4S] de la protéine reposait principalement sur un spectre UV-visible (non présenté), ce qui est insuffisant pour établir la nature chimique du cluster. Deuxièmement, le test d'activité de l'enzyme présenté n'était pas optimal du fait que la reconstitution du cluster avait lieu en même temps que la réaction enzymatique. Ceci pourrait notamment expliquer les valeurs de constantes catalytiques mesurées, montrant une faible affinité pour le substrat (avec un  $K_m$  de 1,78 mM) et un  $k_{cat}$  de  $39,6 \text{ s}^{-1}$  [Tchong, 2005]. Enfin, il n'y avait aucune structure cristallographique d'une cystéine désulfidase déposée dans la PDB, limite la caractérisation complète du mécanisme réactionnel de ces enzymes. Ceci est d'autant plus vrai que le mécanisme de l'aconitase, sur lequel se base celui de MjCyuA, ainsi que le mécanisme analogue des sérine déshydratases, n'impliquent pas de soufre. Dans ce domaine, les enzymes non-redox utilisant un cluster [4Fe-4S] catalytique sont principalement associées aux réactions d'insertion de soufre et non à son abstraction (Introduction IV.). De plus, la réaction de désulfuration est généralement assurée par des enzymes qui utilisent des intermédiaires persulfurés, comme c'est le cas pour la cystéine désulfurase ou la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (Cf. Introduction III.). Insi, l'utilisation d'un cluster [4Fe-4S] pour catalyser la désulfuration de la L-cystéine par la cystéine désulfidase était originale pour ce type de réaction. Cette singularité souligne la nécessité d'une caractérisation approfondie de cette famille d'enzymes venant compléter les résultats obtenus lors de l'étude de MjCyuA.

C'est dans cette perspective que ce projet s'est orienté vers la caractérisation biochimique, structurale et fonctionnelle de la cystéine désulfidase de l'archée méthanogène *M. maripaludis* (MmCyuA) et qui partage 51 % d'identité de séquence avec MjCyuA. Nous espérons que la caractérisation du cluster [Fe-S], l'obtention de la structure de MmCyuA ainsi que les tests d'activité enzymatiques *in vitro* apportent des précisions sur le mécanisme réactionnel de cette classe d'enzymes. De plus, en raison de l'absence de structures similaires dans la PDB, il était possible que la résolution de la structure de MmCyuA révèle un nouveau type de repliement protéique. Aux travaux biochimiques et structuraux se sont ajoutées des études fonctionnelles *in vivo* de MmCyuA. Ces études, réalisées en collaboration avec le Dr. W. Whitman de l'Université de Géorgie (États-Unis), ont visé à élucider le rôle et l'importance de la cystéine désulfidase chez cette archée et à vérifier l'hypothèse selon laquelle elle jouerait un rôle dans la

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Problématique

mobilisation enzymatique du soufre (**Figure 1**). Tout comme *M. jannaschii*, *M. maripaludis* est un organisme strictement anaérobie, cultivé dans des environnements riches en sulfure (1 à 3 mM) mais à 37°C au lieu de 85°C.

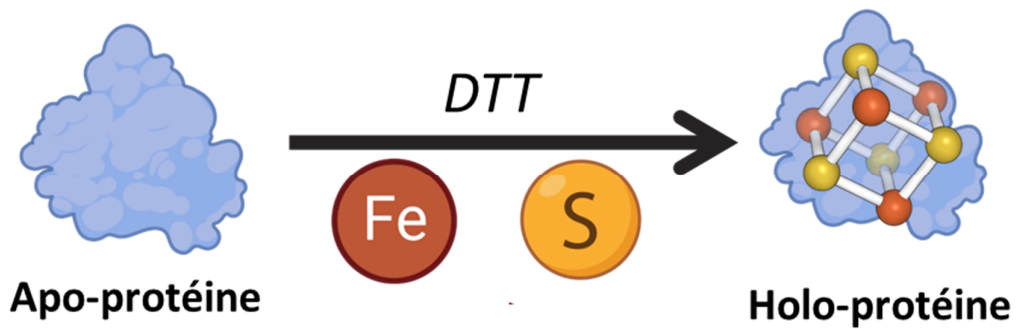
Récemment, différentes cystéine désulfidases ont été identifiées chez plusieurs bactéries, dont *Escherichia coli* [Shimada, 2016 ; Nonaka, 2017 ; Zhou, 2022], *Yersinia ruckeri* [Mendez, 2011], *Clostridium difficile* [Gu, 2018] et *Salmonella enterica* [Loddeke, 2017]. En collaboration avec le Dr. P. Garcia et le Dr. F. Barras de l'Institut Pasteur, notre objectif était de compléter l'étude fonctionnelle de MmCyuA tout en mettant à jour les analyses phylogénétiques précédemment citées [Liu, 2010 ; Kotera, 2010].

### III. Déroulement du projet

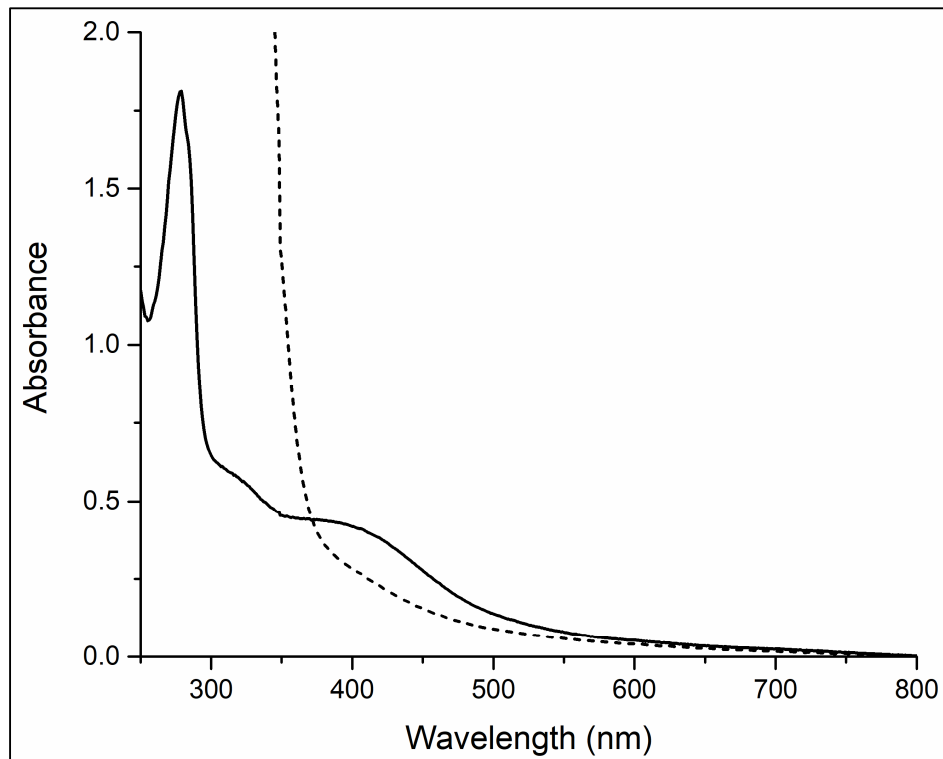
La section suivante sert de complément à la lecture de l'article, offrant une perspective personnelle et chronologique des travaux entrepris. L'ensemble des méthodes utilisées et des résultats obtenus au cours de ce projet sont détaillés dans l'article.

#### Travaux antérieurs réalisés avant le début de cette thèse

La caractérisation de MmCyuA avait été initiée par une ancienne post-doctorante du laboratoire, Dr. N. He, avant mon arrivée au laboratoire. Dr. He avait déterminé les conditions d'expression de la protéine recombinante et l'avait purifiée en condition aérobie. Puis des essais de reconstitution du cluster avaient été réalisées *in vitro* sous des conditions anaérobies strictes en incubant l'enzyme avec un excès de fer II et une source de soufre, de la L-cystéine et la cystéine désulfurase CsdA, en présence d'un agent réducteur, le DTT (**Figure 36**). La protéine résultante, dotée d'un cluster [Fe-S] et désormais nommée holo-MmCyuA, présentait un spectre d'absorption UV-visible avec des caractéristiques typiques d'un cluster [4Fe-4S], notamment une absorption spécifique autour de 400 nm (**Figures 37** et Article 1, Figure S2C). Dr. He a ensuite réalisée des tests d'activité enzymatique *in vitro* en incubant holo-MmCyuA avec de la L-cystéine et en mesurant la production de pyruvate par des méthodes spectroscopiques (Article 1, Material and methods) [Morra, 1991]. Les constantes catalytiques mesurées pour la L-cystéine étaient de  $K_m = 1$  mM et  $k_{cat} = 23.8$  min<sup>-1</sup>. Les tests avec la L-sélénocystéine ont donné des valeurs de  $K_m = 5.4$  mM et  $k_{cat} = 15.9$  min<sup>-1</sup>. L'enzyme était inactive sous sa forme dépourvue de cluster [Fe-S] (apo-MmCyuA), soulignant le rôle catalytique du cofacteur. De plus, les tests d'activité ont révélé que la L-sérine fonctionne comme un inhibiteur compétitif de l'enzyme, avec un  $K_i$  de 0.60 mM. Enfin, dans une étude préliminaire sur la caractérisation fonctionnelle de l'enzyme, le Dr. He avait montré que l'incubation de MmCyuA avec la L-cystéine permettait de fournir le soufre pour deux enzymes de thiolation de l'ARNt du même organisme, MmTtuI et MmNcsA (Article 1, Figure S6).



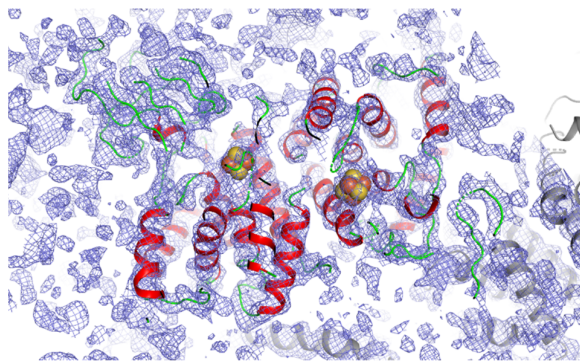
**Figure 36 : Illustration du protocole de reconstitution *in vitro* du cluster [Fe-S].** Le fer utilisé correspond généralement à un sel de fer. La source de soufre correspond à un mélange de cystéine et de cystéine désulfurase CsdA ou du sulfure inorganique dans le cas de MmCyuA.



**Figure 37 : Spectre d'absorption UV-visible de holo-MmCyuA (trait plein) et de holo-MmCyuA réduite après incubation au dithionite.**

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Déroulement

De plus, le cluster avait été caractérisé par spectroscopie RPE (Résonance paramagnétique électronique). Après réduction au dithionite, la protéine présentait un spectre RPE caractéristique d'un centre  $[4\text{Fe-4S}]^+$ . Cependant, la protéine non réduite présentait aussi un signal, reflétant la présence d'espèces  $[3\text{Fe-4S}]^+$ , résultant probablement d'une dégradation d'une partie des clusters  $[4\text{Fe-4S}]$  de l'échantillon. Par ailleurs, le Dr. He avait effectué des tests de cristallisation de la protéine et obtenu des jeux de données de diffraction dont un de holo-MmCyuA co-cristallisée avec de la sérine, avec une résolution maximale de 2.6 Å. Les cristaux contenaient deux molécules dans l'unité asymétrique. Les tentatives de remplacement moléculaire en utilisant la L-sérine-déshydratase comme modèle (LpSDH, 17 % d'identité de séquence, PDB code 4RQO) s'étaient avérées infructueuses. Le Dr. L. Pecqueur, ingénieur de recherche du laboratoire, avait alors tenté d'exploiter la diffraction anormale des atomes de fer des clusters  $[4\text{Fe-4S}]$  afin résoudre le problème de phase par la méthode SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion). Cependant, en raison du faible nombre d'atomes de fer (8) dans l'unité asymétrique par rapport au nombre d'atomes de protéines (800) et le fait qu'ils n'étaient pas également répartis le long de la séquence de la protéine puisqu'organisés en cluster, le signal anormal obtenu était insuffisant. La carte de densité électronique expérimentale résultante, avec une résolution maximale de 4.5 Å, permettait de ne construire que la structure du domaine C-terminal de la protéine, contenant le cluster (**Figure 38**). Des expériences d'infiltration de cristaux de MCyuA avec divers métaux lourds avaient aussi montré que la protéine pouvait lier le gadolinium (Gd) dans son domaine N-terminal, mais le signal de diffraction anormal était très faible. Ainsi, ce projet de caractérisation de MmCyuA avait été mis en pause dans l'attente de la résolution de la structure.



**Figure 38** : Illustration de la carte de densité électronique expérimentale  $2F_o-F_c$  obtenue par SAD (Fe) au niveau du domaine C-terminal de MmCyuA.

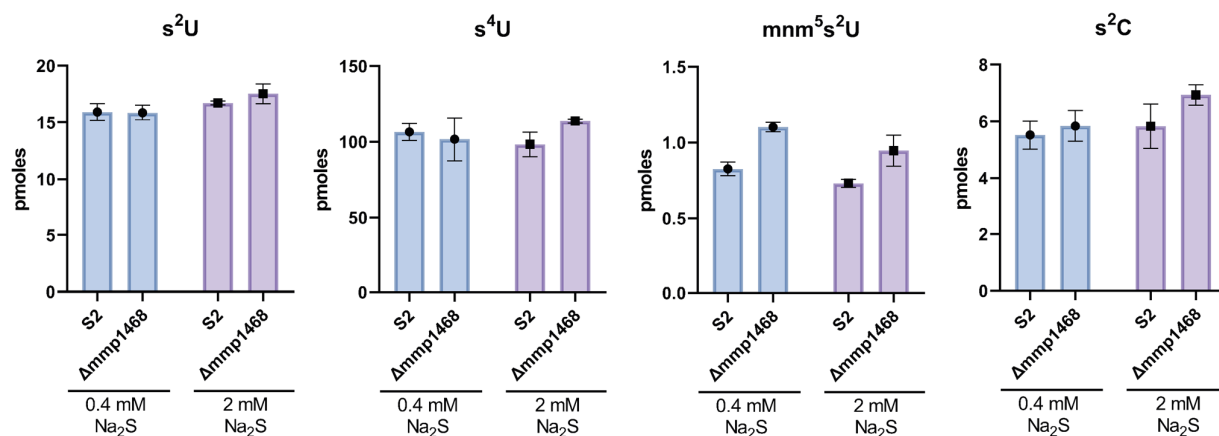
## **Contribution personnelle et travaux réalisés durant cette thèse**

A mon arrivée au laboratoire, on m'a ainsi confié pour mission d'optimiser la reconstitution de holo-MmCyuA pour obtenir une protéine avec un cluster [4Fe-4S] intègre et de résoudre la structure de MmCyuA. Deux différentes stratégies ont été élaborées pour atteindre ce dernier objectif. La première stratégie visait à cristalliser le domaine N-terminal seul et à l'infiltrer par du Gd pour obtenir la structure de ce domaine, qui pourrait ensuite être utilisée pour résoudre la structure complète de la protéine. Cependant, après avoir exprimé le domaine N-terminal recombinant, cette approche a été abandonnée car ce domaine subissait une protéolyse pendant la phase de purification, malgré l'ajout d'antiprotéases au tampon. La deuxième stratégie visait à remplacer les résidus cystéines de MmCyuA par des sélénocystéines, puis à cristalliser la protéine résultante afin d'exploiter le pouvoir anomal du sélénium lors de la résolution de la structure [Strub, 2003]. La résolution de la structure par la méthode classique utilisant le marquage de la protéine par des sélénométhionines (Hendrickson, EMBO J, 1990) avait été écartée car il n'y avait pas de méthionine en dehors de la méthionine N-terminale dans le domaine N-terminal. Pour obtenir la protéine marquée par des sélénocystéines, la protéine a été exprimée dans une souche auxotrophe à la cystéine et cultivée dans un milieu riche jusqu'à l'induction de l'expression protéique. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu minimal sans cystéine, auquel la sélénocystéine a été ajoutée. Cependant, lors de l'expression protéique, des signes visuels de lyse cellulaire ont été observés, suivi d'un arrêt complet de la croissance microbienne. Sachant que la L-sélénocystéine est un substrat de l'enzyme, ce résultat pourrait être imputé à l'activité enzymatique de MmCyuA qui générerait du sélénium libre, cytotoxique pour les cellules.

En parallèle, de nouvelles tentatives de reconstitution in vitro du cluster [4Fe-4S] de MmCyuA ont été effectuées. Habituellement, la source de soufre pour cette réaction provient de L-cystéine, à une concentration 5,5 fois supérieure à celle de la protéine à reconstituer (1,3 fois la quantité de [4Fe-4S] par molécule), associée à une cystéine désulfurase (CsdA). Cependant, puisque la cystéine est également le substrat de CyuA, l'enzyme se trouve en conditions de catalyse au cours de la réaction, qui s'étale sur plusieurs heures. Pour contourner cette situation, j'ai donc utilisé du sulfure inorganique comme source de soufre pour la reconstitution. Le spectre UV-visible de holo-MmCyuA obtenu après ce protocole de reconstitution est caractéristique d'un cluster [4Fe-4S]. De même, le spectre RPE de la protéine réduite a attesté de la présence du cluster [4Fe-4S] et aucun signal n'a été détecté pour l'échantillon témoin non réduit (Article 1, Figure S4B).

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Déroulement

Le deuxième objectif concernant le projet CyuA était de comprendre sa fonction *in vivo*, projet en collaboration avec l'équipe de William Whitman (Université de Géorgie, Athens, USA), spécialiste de l'archée *M. maripaludis*. Pour évaluer le rôle de MmCyuA dans le métabolisme cellulaire (Article 1, Figure 2), il a d'abord fallu générer une souche de *M. maripaludis* dépourvue du gène codant pour MmCyuA ( $\Delta mmp1468$ ). Pour cela, j'ai conçu une cassette de délétion pour le gène *mmp1468* en utilisant des méthodes de biologie moléculaire classiques, utilisant la PCR, la digestion par enzymes de restriction et la ligation d'ADN. Nos collaborateurs ont ensuite transformé *M. maripaludis* avec cette cassette de délétion [Tumbula, 1994] puis nous ont fourni des culots cellulaires des souches sauvage et du mutant  $\Delta mmp1468$ . En plus de l'étude comparée de croissance des deux souches dans différentes conditions de source de soufre, nous voulions mesurer les taux de nucléosides thiolés dans les ARNt des deux souches afin de déterminer si le système MmCyuA/cystéine pouvait fournir du soufre aux enzymes de thiolation de l'ARNt *in vivo*, à l'instar des cystéine désulfurases. J'ai donc extrait et purifié les ARNt entiers des deux souches qui ont été hydrolysés en nucléosides. J'ai ensuite réalisé une première analyse qualitative de ces nucléosides par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) pour caractériser les modifications chimiques présentes. Les échantillons ont ensuite été transmis au Dr. Ravanat (CEA Grenoble) pour une analyse quantitative par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) en utilisant des standards des nucléosides modifiés. Cependant, les taux de nucléosides thiolés se sont avérés similaires dans la souche sauvage et la souche mutante cultivée en présence de 0.4 ou 2 mM de sulfure inorganique (Figure 39).



**Figure 39** : Quantification of several thiolated nucleosides in S2 and  $\Delta mmp1468$  *M. maripaludis* strains grown in the presence of 0.4 or 2 mM Na<sub>2</sub>S. 2-thiouridine (s<sup>2</sup>U), 4-thiouridine (s<sup>4</sup>U), 5-cyanomethyl-2-thiouridine (cnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U), 2-thiocytidine (s<sup>2</sup>C).

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Déroulement

En juillet 2021, la parution de l'article sur la prédiction de la structure des protéines à partir de leur seule séquence primaire, via le programme AlphaFold2 [Jumper, 2021], m'a permis de résoudre la structure cristallographique de MmCyuA. En effet, cet article s'accompagnait de la mise à disposition d'une base de données contenant les structures prédites de protéines de divers organismes, dont *M. jannaschii*. La structure de MmCyuA a été facilement résolue par remplacement moléculaire en utilisant MjCyuA comme modèle. La structure de MmCyuA ainsi obtenue a ensuite été affinée avec l'aide du Dr. Pecqueur (Article 1, Table 1). Cependant, l'affinement de cette structure s'est avérée difficile, notamment au niveau du cluster. La densité électronique correspondante (cartes 2Fo-Fc, anormale (Fe) ou omit) ne semblait pas correspondre à un cluster [4Fe-4S]. L'affinement indiquait une occupation moyenne de 54% pour les atomes du cluster et la géométrie des cystéines liant les quatre atomes de fer n'était pas correcte. En revanche, la modélisation d'un cluster [2Fe-2S] s'est avérée plus satisfaisante (**Figures 40A et B**), notamment en ce qui concerne l'occupation des atomes du cluster (moyenne de 100 %) et la géométrie (Article 1, Figure S10).

Une densité électronique supplémentaire a été observée dans le site actif de la molécule A et a été attribuée à la présence de l'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES), un tampon présent dans la solution de cristallisation à une concentration de 100 mM (**Figure 40C**). De même, une densité électronique supplémentaire a été observée dans le site actif de la molécule B et a été attribuée à la présence d'un ion chlorure, présent à une concentration de 200 mM dans la solution de cristallisation (**Figure 40D**).



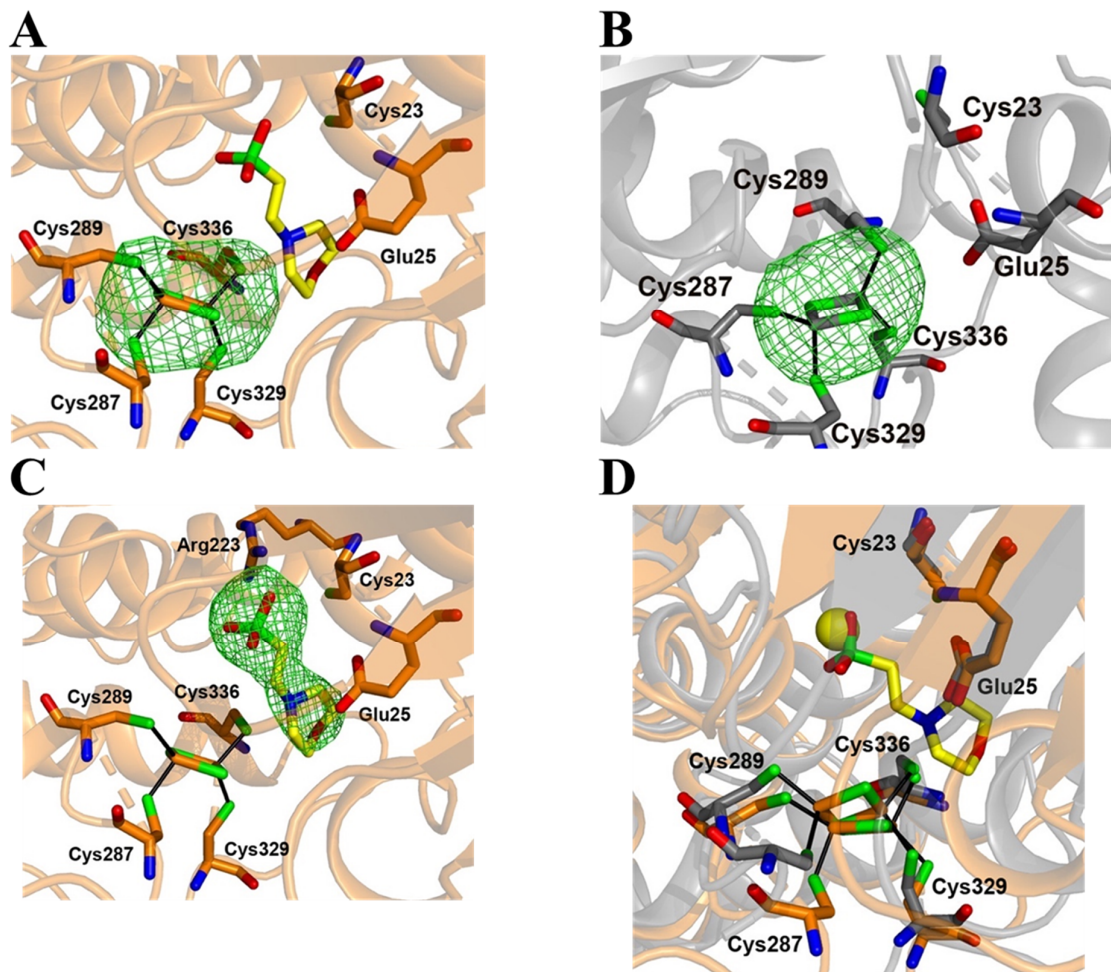


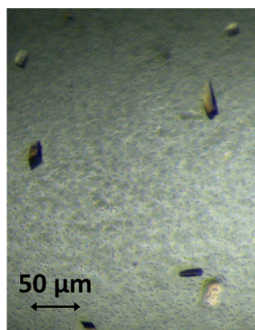
Figure 40 : Structure de MmCyuA co-cristallisée avec de la L-sérine..

- (A et B) Cartes de densité électronique anormale (contourée à  $3,5 \sigma$ ) pour les molécules A et B.
- (C) Carte de densité électronique (contourée à  $3 \sigma$ ) omettant le ligand (MES) dans le site actif de la molécule A.
- (D) Superposition des sites actifs des molécules A (en orange) et B (en gris). Le chlorure dans la molécule B est représenté par une sphère jaune.

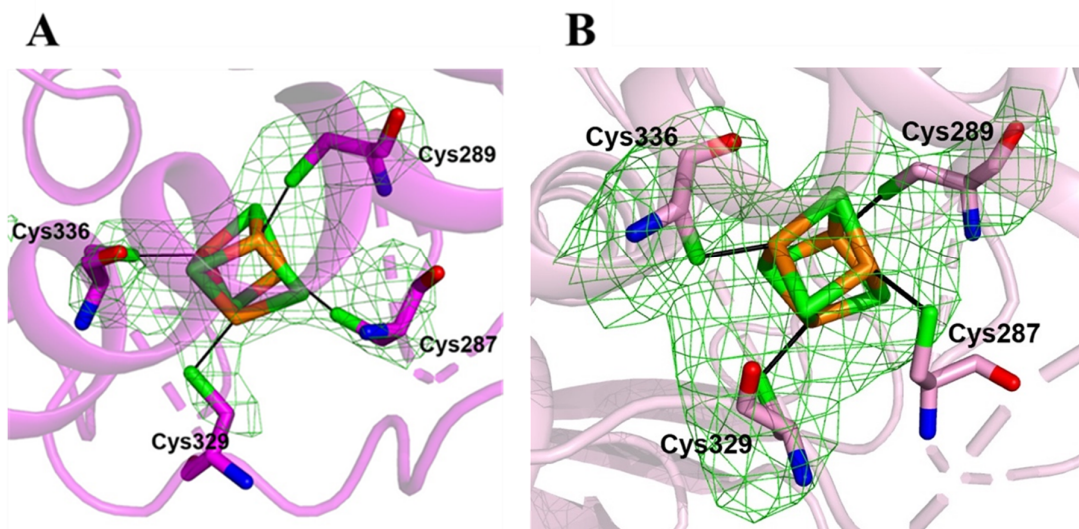
## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Déroulement

Une densité électronique additionnelle dans le site actif de la molécule A a été attribuée à une molécule de L-serine, présente dans les conditions de cristallisation à une concentration de 10 mM (**Figure 9C**) (Article, Figure S11C). De même, une densité électronique additionnelle dans le site actif de la molécule B a été attribuée à un ion sulfate (Article, Figure S11C). Néanmoins, la présence d'un cluster [2Fe-2S] dans la molécule A, qui provient probablement de la dégradation de la forme [4Fe-4S], complique l'interprétation de cette structure.

Comme cette structure montrait la présence d'un cluster [2Fe-2S] au lieu du cluster [4Fe-4S] liant la protéine après reconstitution du cluster, il m'a été confié la tâche d'obtenir une protéine holo-MmCyuA homogène en utilisant le protocole modifié de reconstitution du cluster, afin d'obtenir de nouveaux cristaux de MmCyuA et de réaliser de nouveaux tests d'activité enzymatique. La protéine recombinante MmCyuA, exprimée avec un tag histidine (6-His) en N-terminal, a été purifiée en condition aérobie par chromatographie d'affinité au nickel, puis par chromatographie d'exclusion stérique (Article 1, Figure S2A). Après l'étape de reconstitution du cluster [Fe-S] (Article 1, Material and methods), des essais de cristallisation de holo-MmCyuA ont été effectués, sans ligand ou en co-cristallisation avec différents ligands, dans des conditions similaires à celles utilisées par Dr. He (14 % PEG 4000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M NaCl, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NiSO<sub>4</sub>). Malgré de multiples tentatives, aucun cristal n'a été obtenu à partir des préparations contenant un ligand, que ce soit la L-cystéine, la L-sérine ou le pyruvate. Pour obtenir des cristaux de la protéine sans ligand, il a fallu optimiser les conditions de cristallisation en modifiant la concentration en agent précipitant, en incorporant des additifs, ou en ajustant le pH de la solution de cristallisation. Des données de diffraction à 2.9 Å de résolution de MmCyuA non ligandé (Article 1, Table 1) ont finalement été obtenues à partir d'un cristal cristallisé avec 13 % PEG 4000, 0.1 M NaCl, 0.1 M tri-sodium citrate dihydrate pH 5.5, 0.1 M LiSO<sub>4</sub> et 10 % glycérol (Article 1, Material and methods).

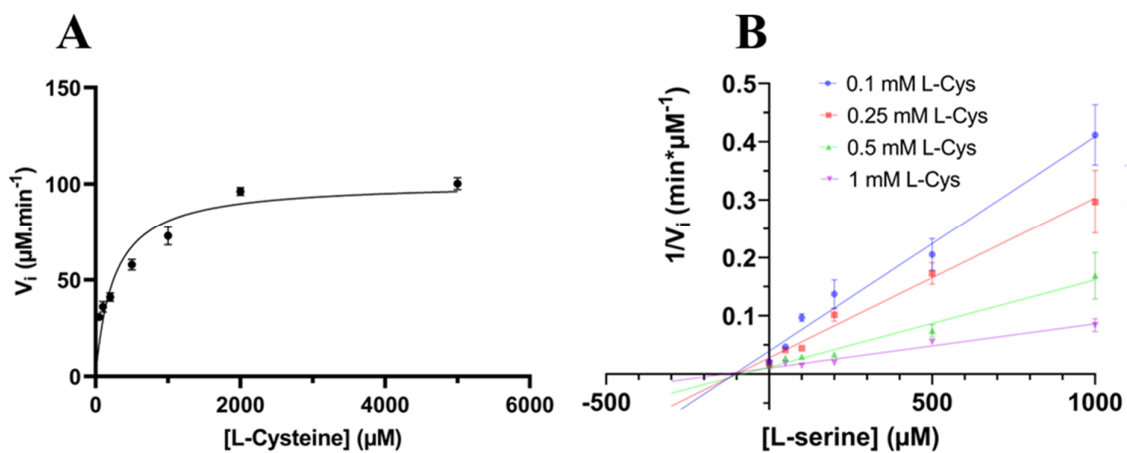


**Figure 41 : Cristaux de holo-MmCyuA** obtenus après optimisation manuelle des conditions de cristallisation avec le PEG 4000 comme agent précipitant



**Figure 42 : Cartes de densité électronique *Fo-Fc* superposées sur le site actif des molécules A (A) et B (B) de holo-MmCyuA non-ligandé**

Cartes de densité électronique omettant le cluster [4Fe-4S] et les 4 cystéines qui y sont liées (contourée à  $3\sigma$ ) pour les molécules A et B.



**Figure 43 : Etudes cinétiques de holo-MmCyuA.**

(A) Régression non linéaire de l'équation de Michaelis-Menten appliquée aux valeurs expérimentales de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale de L-Cystéine (1  $\mu\text{M}$  holo-MmCyuA).

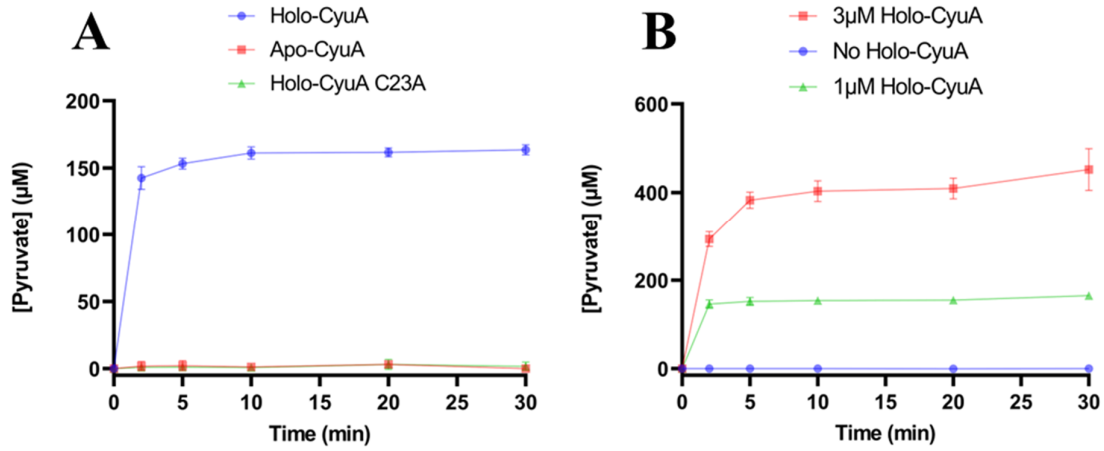
(B) Courbes d'inhibition compétitive de MmCyuA par la L-serine (1  $\mu\text{M}$  holo-MmCyuA)

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Déroulement

L'affinement de la structure, réalisé avec l'aide du Dr. Pecqueur, révèle la présence d'un cluster [4Fe-4S] dans chacune des deux molécules, avec une occupation moyenne des atomes du cluster de 70% (**Figure 42**) (Article 1, Figure S9). Comme dans la structure en complexe avec le MES, le cluster est lié par quatre cystéine. Une densité électronique supplémentaire, observée dans le site actif des deux molécules près de Arg223, a été attribuée à un ion sulfate, présent dans la solution de cristallisation à une concentration de 100 mM.

Enfin, j'ai effectué les études cinétiques de holo-MmCyuA avec une préparation dont le cluster [Fe-S] était reconstitué de la même façon que celui de la préparation utilisée pour la cristallisation. Les constantes catalytiques obtenues — un  $K_m$  de 0.25 mM et un  $k_{cat}$  de  $2.7 \text{ s}^{-1}$  pour la L-cystéine, un  $K_m$  de 0.21 mM et un  $k_{cat}$  de  $1.9 \text{ s}^{-1}$  pour la L-selenocystéine, et un  $K_i$  de 0.11 mM pour la L-serine — sont différentes que celles mesurées précédemment (**Figures 43 et 44B**) (Article 1, Figure S5) et indiquent une meilleure affinité pour les substrats.

La structure de MmCyuA a montré que les résidus Cys23 et Glu25 sont proches du site actif (Figure 40) et il avait été proposé préalablement que les résidus équivalents, Cys25 et Glu27, joueraient le rôle de résidus catalytiques agissant comme acide et base chez MjCyuA (**Figure 33**). Pour confirmer le rôle de ces résidus dans la catalyse, j'ai donc essayé de produire les deux mutants, E25N et C23A afin de mesurer leur activité enzymatique. Toutefois, le mutant E25N n'était pas soluble, quelles que soient les conditions d'expression testées (Article 1, Figure S11A). Le mutant C23A en revanche a pu être produit, purifié, et la reconstitution de son cluster [Fe-S] a été effectuée avec succès (Article 1, Figures S11B, C et D). Les tests d'activité effectués sur ce mutant ont montré que celui-ci est inactif (**Figure 44A**) (Article 1, Figure 3).



**Figure 44 : Etudes cinétiques de holo-MmCyuA**

(A) Etudes cinétiques comparative de Apo-, Holo-MmCyuA et le mutant holo-MmCyuA C23A (1 μM d'enzyme)

(B) Etudes de linéarité de holo-MmCyuA (1 mM L-cystéine)

## IV. Discussion

Notre travail sur MmCyuA offre de nouvelles perspectives sur la famille encore peu étudiée des cystéine désulfidases grâce à la caractérisation biochimique, structurale et fonctionnelle d'une de ces enzymes. En mettant en perspective les résultats présentés dans l'article 1 joint avec les informations présentées durant l'introduction du projet, nous discuterons d'abord du mécanisme catalytique utilisé par MmCyuA. Ensuite, ce mécanisme sera comparé à celui d'autres familles d'enzymes, dont certaines ont été détaillées dans l'introduction de la thèse. Enfin, de manière plus générale, le rôle fonctionnel de la cystéine désulfidase au sein de la cellule sera débattu.

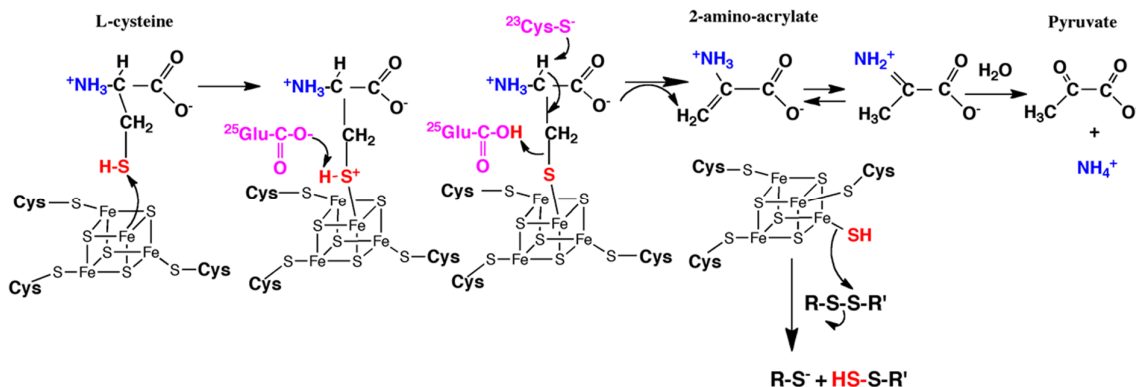
### IV.1. De la caractérisation biochimique et structurale de la cystéine désulfidase

La caractérisation spectroscopique et structurale de holo-MmCyuA, présentée dans l'Article 1, confirme les résultats obtenus pour MjCyuA [Tchong, 2005], à savoir que les cystéine désulfidases sont capables de lier un cluster [4Fe-4S] (Article 1, Figures 4 et Figure S4). Toutefois, alors qu'il avait été proposé que le cluster de MjCyuA soit lié par seulement trois cystéines pour que le mécanisme catalytique fasse intervenir la liaison du substrat cystéine au quatrième atome de Fe libre (Figure 33), les structures cristallographiques de MmCyuA révèlent que le cluster [4Fe-4S] est lié à quatre autres cystéines (Cys287, Cys289, Cys329, Cys336) dont seulement trois sont strictement conservées (Article 1, Figure S7B). La Cys287 conservée et la Cys289 non conservée appartiennent à une boucle flexible.

La structure cristallographique de MmCyuA montre que Glu25 est le meilleur candidat pour jouer le rôle de base et déprotonner le substrat cystéine lors de la catalyse. (Article 1, Figure 4B) L'importance de ce résidu est soulignée par le fait que sa mutation en glutamine conduit à une protéine insoluble (Article 1, Figure S11). Néanmoins, de nouvelles mutations conduisant à des protéines solubles sont nécessaires pour confirmer l'importance de Glu25 dans la catalyse. Chez MjCyuA, la cystéine 25 avait été proposée pour jouer ce rôle de base (**Figure 33**), puisque sa mutation inactivait l'enzyme [Tchong, 2005]. Cependant, la structure de MmCyuA montre que le résidu équivalent, la cystéine 23 (Cys23) semble trop éloigné du cluster pour jouer le rôle de base dans la catalyse (Article 1, Figure 4B). De plus, il apparaît que Cys23, contrairement au Glu25, n'est pas strictement conservée, lorsqu'un très grand nombre de

séquences sont analysées par AlphaFold2 (Article 1, Figure S7A). Toutefois, étant donné que la mutation de Cys23 en alanine inactive l'enzyme (**Figure 44A**) et qu'elle se situe à proximité d'un site de liaison anionique (Article, Figure 4B), il est envisageable qu'elle joue un rôle important dans la catalyse, bien que celui-ci demeure incompris.

A partir de ces observations, des structures cristallographiques et des tests d'activité de MmCyuA, nous pouvons proposer un mécanisme pour la réaction de désulfuration de la L-cystéine (**Figures 45** et Article 1, Figure 6). D'abord, un changement de conformation éloignerait la cystéine non conservée, Cys289, du cluster pour permettre la liaison du groupement thiol du substrat cystéine sur le quatrième Fe du cluster rendu libre. Ensuite, Glu25 pourrait déprotoner le C<sub>α</sub> de la cystéine substrat, entraînant la formation d'un cluster [4Fe-5S] et le produit 2-amino-acrylate, qui se tautomériserait en acide 2-iminopropionique et serait rapidement hydrolysé pour former les produits finaux, pyruvate et ammonium. Le [4Fe-5S] pourrait transférer son soufre terminal à une protéine acceptrice. Cette hypothèse concorde avec la capacité, observée *in vitro*, de MmCyuA à fournir du soufre aux enzymes de thiolation de l'ARNt, NcsA et TtuI (Article 1, Figure S6).



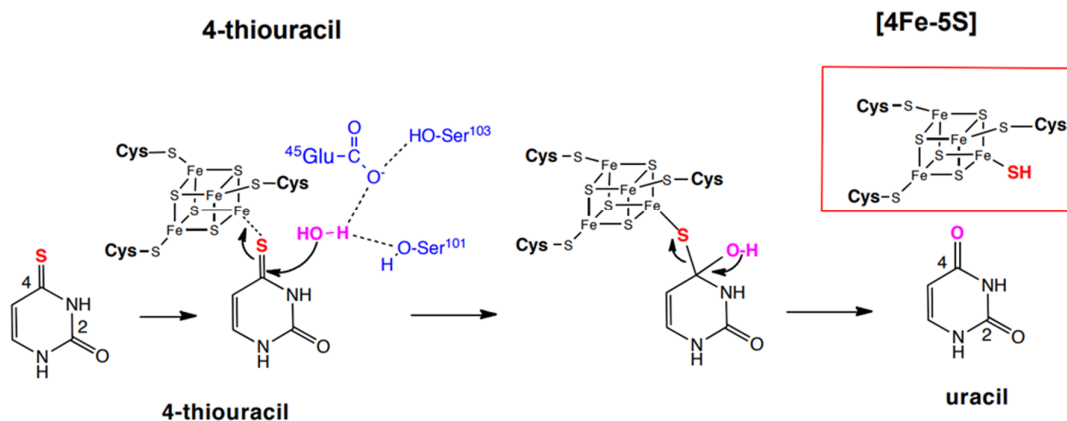
**Figure 45** : Mécanisme catalytique proposé pour la désulfuration de la L-cystéine par MmCyuA.

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Discussion

Le mécanisme enzymatique de la cystéine désulfidase [4Fe-4S]-dépendante, pour une réaction de désulfuration de la L-cystéine, est différent de celui utilisé par les cystéines désulfurases, PLP-dépendantes, qui font intervenir des intermédiaires persulfurés (Cf. Introduction III.). De plus, alors que la plupart de enzymes utilisant un cluster [4Fe-4S] pour catalyser des réactions non redox sont impliquées dans des réactions d'insertion de soufre (Cf. Introduction IV.) [Zhou, 2022], seules la cystéine désulfidase et une thiouracile désulfidase (TudS) [Zhou, 2021 ; Fuchs, 2023] catalysent des réactions de désulfuration. En effet, la thiouracile désulfidase, récemment caractérisée, catalyse l'extraction du soufre du 2-thiouracil, du 4-thiouracil, du 4-thio-UMP et du 4-thio-UTP, avec une préférence pour le 4-thio-UMP grâce à une réaction non redox faisant intervenir un cluster [4Fe-4S] [Zhou, 2021 ; Fuchs, 2023]. Dans le but de capturer un intermédiaire catalytique de l'enzyme, des cristaux de holo-TudS ont été incubés avec différentes concentrations de substrat 4-thiouracile avant d'être congelés à différents temps. Une densité électronique a pu être observée près de l'atome de Fe du cluster qui n'est pas lié à la protéine. Cette densité pouvait correspondre à un ion hydrogènesulfure ou à un ion chlorure [Zhou, 2021]. Considérant que cette densité n'était présente qu'après incubation avec le substrat, et sachant qu'il n'y avait que 20 mM de NaCl dans la solution de cristallisation, cette densité a été attribuée à un ion hydrogènesulfure provenant du soufre arraché au 4-thiouracile par l'enzyme [Zhou, 2021 ; Zhou, 2022]. Cela a conduit à la proposition d'un mécanisme de désulfuration du 4-thiouracile qui génère un intermédiaire [4Fe-5S], où un résidu glutamate conservé facilite la déprotonation de la molécule d'eau qui attaque le carbone portant la fonction SH du thiouracil lors de la première étape de la réaction (**Figure 46**) [Zhou, 2021]. Cette caractérisation structurale de TudS représente donc un premier exemple d'utilisation non-redox d'un cluster [4Fe-4S] dans une réaction de désulfuration, auquel vient s'ajouter notre caractérisation de MmCyuA.

Les travaux menés par le Dr. P. Garcia au cours de ce projet ont révélé que la cystéine désulfidase est phylogénétiquement proche de la sous-classe des sérine déshydratases (LSD) liant un cluster fer-soufre. Ces dernières utilisent un cluster [4Fe-4S] catalytique dans cette réaction non redox, très similaire à la réaction catalysée par MmCyuA (**Figure 35**) [Cicchillo, 2004 ; Thoden, 2014]. En accord avec l'analyse phylogénétique, l'analyse de la structure cristallographique de MmCyuA avec le programme DALI révèle que la structure la plus proche dans la PDB est celle de la sérine déshydratase de *L. pneumophila* (LpLSD) [Thoden, 2014] malgré une identité de séquence de seulement 17 % entre les deux protéines.

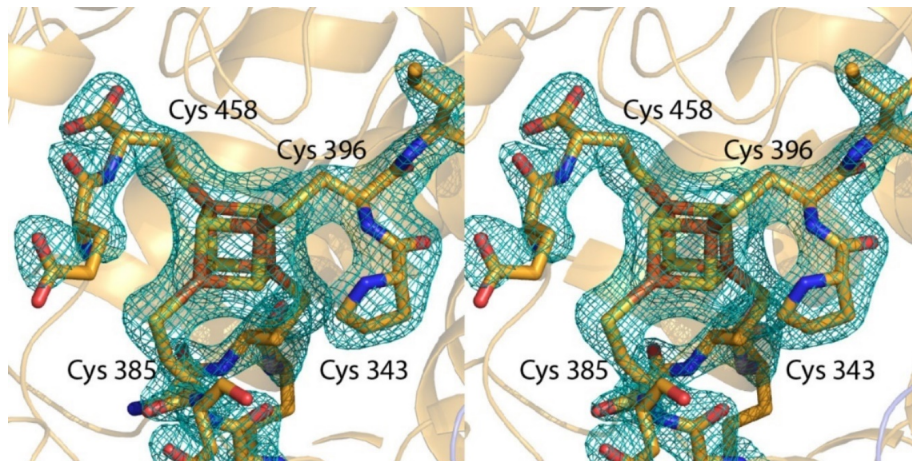




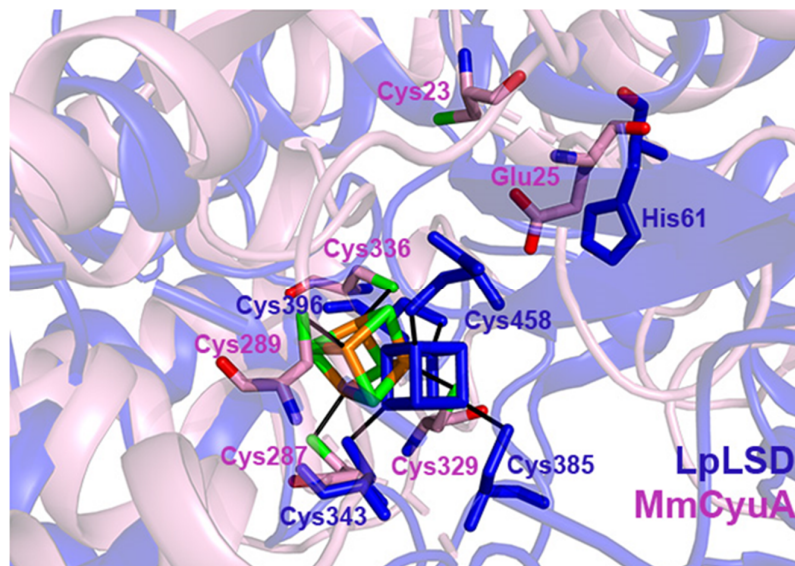
**Figure 46 : Mécanisme catalytique proposé pour la désulfuration de la 4-thiouracile par TudS [Zhou, 2022].** La réaction impliquerait trois résidus conservés : Glu45, Ser101 et Ser103. Initialement, le 4-thiouracile se lierait à TudS, avec son atome de soufre coordonné à l'atome de fer du cluster [4Fe-4S], non lié à la protéine, et à une molécule d'eau. Cette molécule d'eau, activée par des liaisons hydrogène avec Ser101 et Glu45, agirait comme un nucléophile et attaquerait la liaison C-H du thiouracile. La déprotonation subséquente du groupe hydroxyle de l'intermédiaire [4Fe-4S]-thiouracile aboutirait à la libération d'uracile et à la formation d'un intermédiaire [4Fe-5S].

La superposition des domaines catalytiques des deux protéines révèle une homologie structurale au niveau de leur site actif (**Figure 47** ; Article 1, figure 5B). Cela se traduit notamment par la position similaire du cluster [4Fe-4S] et des résidus cystéines qui le lient. Pour LpLSD, une histidine conservée (His61) a été proposée agir comme base pour déprotoner le C $\alpha$  du substrat lors de la réaction de désulfuration étant donnée sa position dans la structure et du fait que sa mutation en alanine entraîne une perte totale de l'activité catalytique [Thoden, 2014]. La superposition structurale indique que Glu25 de MmCyuA occupe une position similaire à His61 de LpLSD (**Figure 47** ; Article 1, figure 5B), arguant pour son rôle comme base dans la catalyse. De façon intéressante, la structure de LpLSD ne présente pas de résidu équivalent à Cys23 de MmCyuA, suggéré pour agir comme base déprotonant le C $\alpha$  du substrat lors de la réaction de désulfuration dans le cas de MjCyuA (**Figure 47**).

Étonnamment, la structure de LpLSD révèle que les quatre atomes de fer du cluster sont liés à quatre cystéines de la protéine (**Figure 48**), un phénomène également observé pour MmCyuA (**Figure 42**). Chez LpLSD, il s'agit des trois cystéines conservées et de la cystéine située en C-terminal (**Figure 48**). Il a été proposé que cette cystéine mime la L-sérine substrat liée au cluster [Thoden, 2014]. L'insertion du segment C-terminal de la protéine dans la cavité du site actif entraîne le l'enfouissement du cluster dans la protéine. Or, comme le cluster doit être accessible au solvant pour lier le substrat, il a été postulé que cette structure de LpLSD représente une conformation non active de l'enzyme [Thoden, 2014]. Des expériences supplémentaires d'échange hydrogène-deutérium combinées à de la spectrométrie de masse ont été menées pour étudier les changements conformationnels de l'apo- et de l'holo-LpDH en solution [Yan, 2015]. Les résultats indiquent que, l'extrémité C-terminale, initialement mobile, s'insère dans le site actif lors de la liaison du cluster [4Fe-4S]. Cette forme non catalytique de l'enzyme assurerait une fonction protectrice en l'absence de substrat, en accord avec la grande résistance du cluster de LpLSD à la dégradation par l'oxygène [Thoden, 2014 ; Yan, 2015]. De façon similaire, la liaison du cluster de MmCyuA par quatre cystéines pourrait correspondre à une structure pré-catalytique.



**Figure 47** : Carte de densité électronique *Fo-Fc*, contournée à  $3 \sigma$ , superposée sur le site actif de la structure de la L-sérine déshydratase (LpLSD ; référence PDB 4RQO) [Thoden, 2014].



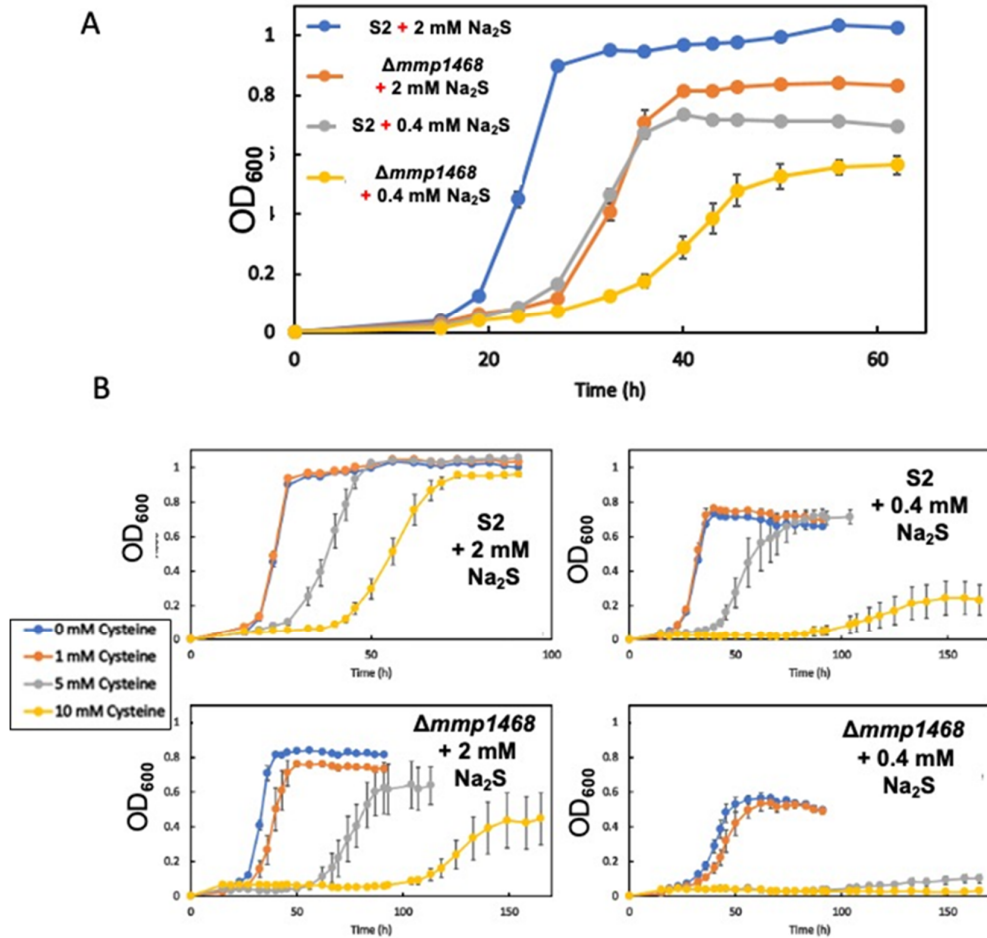
**Figure 48** : Superposition des sites actifs de MmCyuA (molécule A, colorée en rose) et de LpLSD (colorée en bleu), référence PDB 4RQO. (Article 1, figure 5B)

## IV.2. De la caractérisation fonctionnelle de la cystéine désulfidase

### IV.2.1. Etudes fonctionnelles de la cystéine désulfidase chez *M. maripaludis* (MmCyuA)

Pour étudier l'importance physiologique de MmCyuA, nous avons procédé à la délétion du gène correspondant (*mmp1468*) chez *M. maripaludis*, créant ainsi la souche mutante  $\Delta mmp1468$ . Des tests initiaux de croissance cellulaire ont été effectués dans différents milieux de culture, avec des concentrations variables de sulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ). Le milieu considéré comme « optimal » contient 2 mM de  $\text{Na}_2\text{S}$  [Jones, 1983 ; Liu, 2012]. Un autre milieu, doté de 0.4 mM de  $\text{Na}_2\text{S}$ , a été testé pour simuler des conditions déficientes en sulfure. Les résultats de ces expériences révèlent que la souche  $\Delta mmp1468$  présente un retard de croissance en comparaison avec la souche sauvage S2 dans les deux environnements testés (**Figure 49A**). Ce déficit se manifeste en termes de taux de croissance, de rendement en biomasse et de temps de latence initial (Article 1, Figure 2A et Table S1). Ainsi, bien que la délétion du gène *mmp1468* affecte négativement la croissance de *M. maripaludis*, l'absence de CyuA ne s'avère pas létale lorsque le sulfure est la seule source de soufre disponible. Autrement dit, CyuA n'est pas indispensable à la survie de l'organisme en absence de cystéine.

Lors d'une expérience précédente, un mutant de *M. maripaludis* auxotrophe pour la cystéine a été cultivé en présence de 1,5 mM de  $\text{Na}_2\text{S}$  enrichi en  $^{34}\text{S}$  et de 3 mM de cystéine non marquée. À l'issue de la croissance cellulaire, la concentration du  $\text{Na}_2\text{S}$  marqué avait diminué de 14 %. Cette baisse avait été attribuée à la dilution du sulfure marqué par du sulfure non marqué, probablement produit par une enzyme catalysant la désulfuration de la cystéine [Liu, 2010]. Ces observations suggèrent que l'expression du gène *cyuA* pourrait être induite en présence de cystéine dans le milieu.



**Figure 49 : Croissance des souches S2 et  $\Delta mmp1468$  de *M. maripaludis* en présence de Na<sub>2</sub>S .**

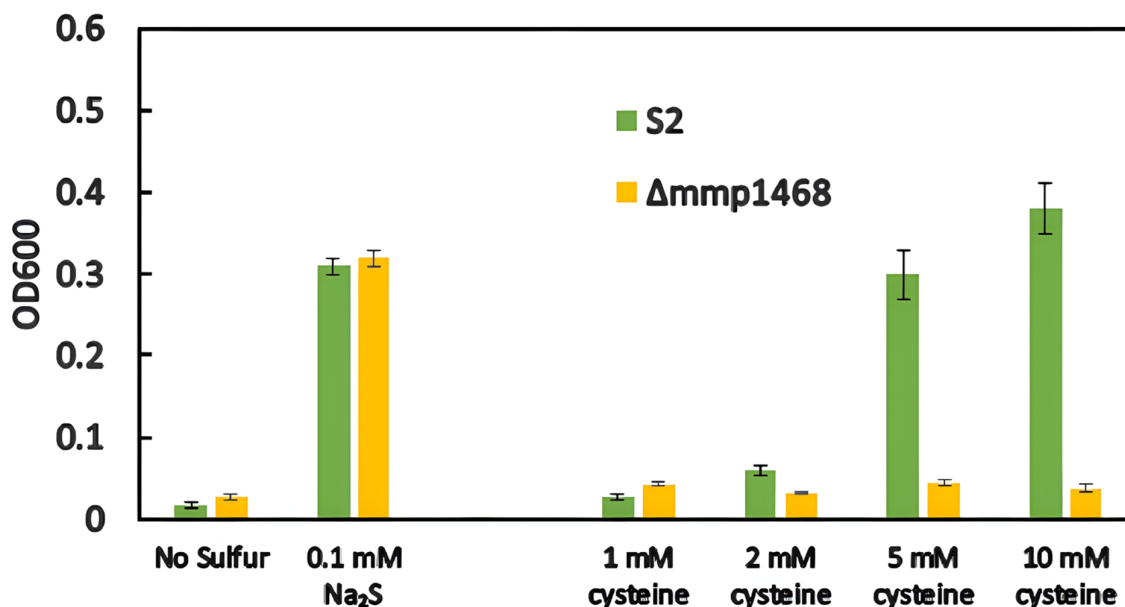
(A) Les souches S2 et  $\Delta mmp1468$  ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire dans un milieu enrichi en formate avec 2,0 mM ou 0,4 mM de Na<sub>2</sub>S.

(B) Les souches S2 et  $\Delta mmp1468$  ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire dans un milieu enrichi en formate avec 2,0 mM ou 0,4 mM de Na<sub>2</sub>S et des concentrations croissantes de L-cystéine de 0 à 10 mM

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Discussion

Bien que la cystéine soit essentielle pour de nombreux processus cellulaires, tels que l'homéostasie redox, le métabolisme du soufre et la biosynthèse des protéines [Mendez, 2011] (Cf. introduction I), une concentration intracellulaire élevée de cet acide aminé peut être cytotoxique [Ono, 1991 ; Gu, 2018 ; Kumar, 2006]. Lorsque la cystéine est présente dans le milieu de culture, elle peut être internalisée dans les cellules en servant de pseudo-substrat pour des protéines d'import dont les substrats sont des acides aminés non polaires [Harris, 1981 ; Soerensen, 1991 ; Kari, 1971 ; Park, 2003]. Si cet afflux de cystéine devient excessif, la concentration intracellulaire de cet acide aminé libre peut atteindre un seuil susceptible d'inhiber les enzymes biosynthétiques, de perturber le métabolisme des métaux et de provoquer un stress oxydatif [Harris, 1981 ; Soerensen, 1991 ; Kari, 1971, Park ; 2003]. Expérimentalement, cette accumulation se manifeste par une inhibition initiale de la croissance chez certains organismes, comme observé chez *E. coli* [Kari, 1971 ; Kumar, 2006 ; Zhou, 2022].

Cela s'applique également à *M. maripaludis*. En effet, une croissance cellulaire, bien que très lente, est observée avec de la cystéine comme unique source de soufre, et ce uniquement pour la souche sauvage S2 (**Figure 50** et **Tableau 4**). Cela suggère donc que MmCyuA confère à *M. maripaludis* la capacité d'utiliser la cystéine comme source de soufre lorsque la concentration de sulfure dans le milieu est faible ou inexistante. Avant de conclure quant à cette caractérisation fonctionnelle de MmCyuA, il peut être judicieux de comparer ces résultats avec ceux d'études fonctionnelles menées sur les orthologues de CyuA chez d'autres organismes.



**Figure 50 : Croissance des souches S2 et  $\Delta mmp1468$  de *M. maripaludis* en présence de Na<sub>2</sub>S et/ou de cystéine.** La densité optique indiquée correspond à celle mesurée en fin de culture cellulaire. Le gène *mmp1468* permet à *M. maripaludis* d'utiliser exclusivement la cystéine comme source de soufre pour sa croissance.

**Tableau 4 :** Influence des concentrations de sulfure et de L-cystéine sur les taux de croissance, les rendements cellulaires finaux et les temps de latence chez *M. maripaludis* S2 (sauvage) et  $\Delta mmp1468$ . N.G. signifie qu'aucune croissance n'a été observée dans les 500 heures. N.D. correspond à 'Non déterminé'. (Article, Table S2)

High inoculum: 10<sup>7</sup> cells per 5 mL culture

Strain	Na <sub>2</sub> S (mM)	L-cysteine (mM)	Growth rate (h <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> (doubling time in h)	Final OD <sub>600</sub>	Lag Time (h)
S2	0.1	0	N.D.	0.31	<16
$\Delta mmp1468$	0.1	0	0.057 +/- 0.005 (12)	0.32	16
S2	0	5	0.036 +/- 0.01 (19)	0.3	440
$\Delta mmp1468$	0	5	N.G.	N.G.	N.G.
S2	0	10	0.027 +/- 0.002 (26)	0.38	230
$\Delta mmp1468$	0	10	N.G.	N.G.	N.G.

#### IV.2.2. Etudes fonctionnelles d'orthologues de la cystéine désulfidase

Le rôle physiologique de CyuA a été étudié chez plusieurs bactéries, y compris *C. difficile* [Gu, 2018], *E. coli* [Loddeke, 2012 ; Nonaka, 2017 ; Zhou, 2022], *S. enterica* [Loddeke, 2017], *S. typhimurium* [Zhou, 2022 ; Loddeke, 2012], *Y. ruckeri* [Mendez, 2011] et *M. thermoacetica* [Evans, 2019].

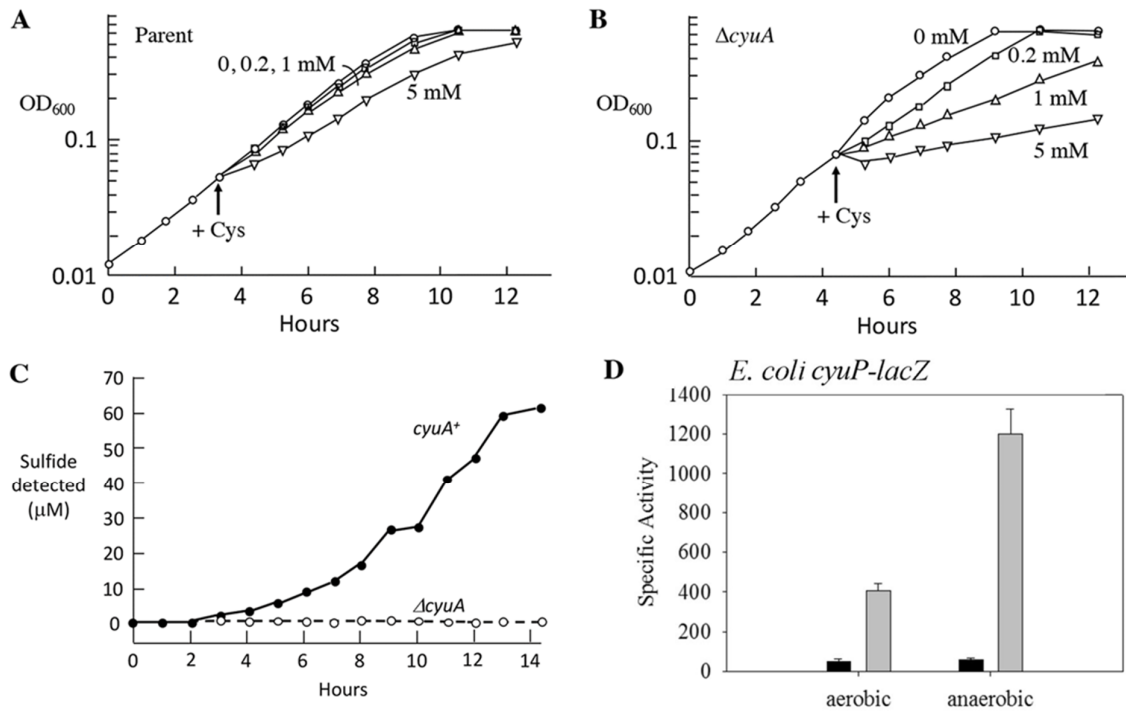
Chez *E. coli* et *S. enterica*, il a été observé qu'une concentration de 5 mM de cystéine perturbait temporairement la croissance des deux organismes en termes de rendement de biomasse [Loddeke, 2017 ; Nonaka, 2017 ; Zhou, 2022]. Le retard de croissance initial était suivi d'une reprise de celle-ci, suggérant une adaptation des microorganismes au milieu (**Figure 51A**) [Loddeke, 2017 ; Zhou, 2022]. En revanche, les souche mutantes  $\Delta cyuA$  de ces deux organismes étaient plus sensibles au phénomène d'inhibition et ne montraient pas de reprise de croissance (**Figure 51B**). Cette différence semble être directement liés à l'activité enzymatique puisque un dosage quantitatif du sulfure dans les cultures cellulaires a révélé que la souche  $\Delta cyuA$  ne produisait que 43 % du sulfure généré par la souche sauvage correspondante (**Figure 51C**) [Loddeke, 2017]. Ces observations concordent avec celles rapportées dans les études fonctionnelles de la cystéine désulfidase de *C. difficile*, *S. typhimurium*, *Y. ruckeri* et *M. thermoacetica*.

Au cours de la caractérisation fonctionnelle de CyuA chez *E. coli*, *S. typhimurium* et *M. thermoacetica*, les différents auteurs ont observé que l'ajout de cystéine au milieu de culture induisait l'expression du gène codant pour l'enzyme. Chez *E. coli*, le gène *cyuA* est situé dans un opéron nommé *cyuPA*, qui contient également le gène *cyuP* codant pour un importateur de cystéine [Zhou, 2022]. Une étude transcriptomique de RNA-seq sur *E. coli* a montré que le niveau de transcription basal de cet opéron est relativement faible dans des conditions de cultures optimales [Korshunov, 2019], en accord avec les études de transcriptomiques de *M. maripaludis* citées précédemment. L'étude montrait également que l'expression de l'opéron est fortement induite lorsque de la cystéine est ajoutée au milieu de culture [Korshunov, 2019].

Une étude plus récente chez *E. coli* propose que le rôle principal de CyuA serait de permettre à la cellule d'exploiter la cystéine comme seule source d'azote, de carbone et d'énergie en conditions anaérobies (**Figure 52**) [Zhou, 2022].



Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Discussion

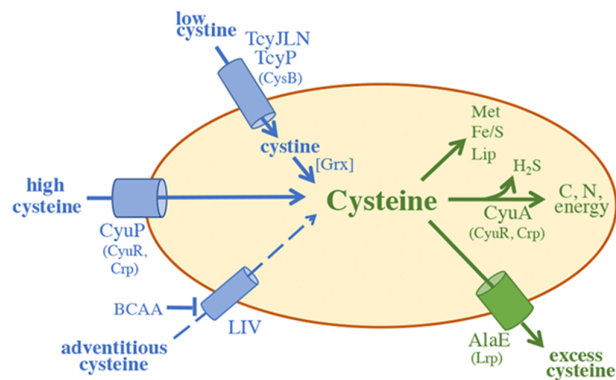


**Figure 51 : Caractérisation fonctionnelle de CyuA chez *E. coli*.**

(A) et (B) Croissance des souches sauvages et  $\Delta cyuA$  en présence ou absence de L-cystéine dans un milieu de culture riche (LB) [Loddeke, 2017].

(C) Mesure de la concentration de sulfure dans le milieu de culture durant la croissance des souches sauvages et  $\Delta cyuA$  [Zhou, 2022].

(D) Activité de la  $\beta$ -Galactosidase dans des souches possédant une fusion *CyuP-lacZ*, cultivées dans des conditions aérobies ou anaérobies, dans un milieu de culture riche, avec (en gris) ou sans (en noir) ajout de L-cystéine [Loddeke, 2017].



**Figure 52 : Schéma simplifié du catabolisme de la cystéine dans le métabolisme d'*E. coli*** [Zhou, 2022]. En abondance, la cystéine exogène peut être importée par CyuP et dégradée par CyuA, servant ainsi de source de carbone ou d'azote. Les protéines impliquées dans ces processus, y compris les transporteurs et les enzymes, sont mentionnées, ainsi que les régulateurs transcriptionnels (indiqués entre parenthèses).

#### IV.2.3. Conclusion de la caractérisation fonctionnelle de la cystéine désulfidase chez l'archée méthanogène *M. maripaludis*

Nos résultats montrent que *M. maripaludis* est capable d'utiliser deux sources de soufre distinctes : le sulfure inorganique et la cystéine, alors que précédemment, il était admis que cette archée ne pouvait pas croître en présence de cystéine comme unique source de soufre. Trois scénarios peuvent être envisagés pour la cellule selon la source de soufre disponible :

(i) En présence exclusive de sulfure inorganique : l'organisme exploite ce sulfure comme principale source de soufre, assurant une croissance cellulaire optimale (**Figure 50**) (Article 1, Figure 2A).

(ii) En présence simultanée de sulfure et de cystéine : l'organisme prioriserait le sulfure comme source de soufre et exploiterait la cystéine exogène via CyuA de façon marginale. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans les cellules cultivées avec les deux sources de soufre et dont le sulfure est marqué au  $^{34}\text{S}$ , il a été estimé que moins de 6 % des atomes de soufre dans les clusters [Fe-S] des protéines de *M. maripaludis* proviennent de la cystéine [Liu 2010]. La voie impliquant MmCyuA pourrait être utilisée lorsque la concentration en sulfure devient critique.

(iii) En présence de cystéine uniquement : celle-ci est utilisée exclusivement comme source de soufre via la cystéine désulfidase mais résulte en un taux de croissance très faible (**Figure 50 et Tableau 4**). Dans cette situation, l'enzyme joue un rôle essentiel, à l'instar de celui des cystéines désulfurases, comme en témoigne la croissance très limitée du mutant *Δmmp1468* (**Figure 50 et Tableau 4**) (Article 1, Table S2).

Nous n'avons pas observé de différence *in vivo* au niveau des quantités de nucléosides thiolés entre les souches *S2* et *Δmmp1468* (**Figure 39**), bien que des expériences *in vitro* aient montré la capacité du système CyuA/Cys à fournir du soufre à plusieurs enzymes de thiolation des ARNt (Article 1, Figure S6). Néanmoins, cette quantification des nucléosides a été réalisée sur des cultures cellulaires cultivées en présence de quantité importante de sulfure inorganique (0.4 ou 2mM). Malheureusement, il n'est pas possible de réitérer ces expériences en cultivant les souches sauvages et mutantes dans un milieu contenant exclusivement de la cystéine comme source de soufre pour espérer observer une variation du taux de nucléosides thiolés entre les deux souches *in vivo* car ces souches poussent extrêmement lentement en présence de cystéine comme seule source de soufre.

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA - Discussion

Notre travail suggère qu'un intermédiaire [4Fe-5S] lié à MmCyuA serait le donneur de soufre central pour les réactions de sulfuration. En présence de concentrations importantes de sulfure inorganique, celui-ci pourrait se lier directement au cluster [4Fe-4S] de CyuA, permettant la formation de l'intermédiaire [4Fe-5S] alors qu'en présence de faibles concentrations de sulfure inorganique, MmCyuA utiliserait la cystéine pour former l'intermédiaire [4Fe-5S].

## Projet 1 : Étude de la cystéine désulfidase CyuA – Article

## **V.Article 1**

L'article qui suit constitue une version préliminaire. Nous travaillons actuellement à finaliser le contenu. Les structures cristallographiques de MmCyuA seront déposées dans la PDB prochainement.

## Insights into the phylogenetic distribution, structure and function of [4Fe-4S]-dependent L-cysteine desulfidase, an enzyme that supplies sulfide to the archaeon *Methanococcus maripaludis*

Paolo Zecchin<sup>1</sup>, Elliot Shelton<sup>2</sup>, Nisha He<sup>1</sup>, Ludovic Pecqueur<sup>1</sup>, Pierre Garcia<sup>3</sup>, Taiwo Akinyemi<sup>2</sup>, Nadia Touati<sup>4</sup>, Ornella Bimai<sup>1</sup>, Christophe Velours<sup>5</sup>, Bruno Faivre<sup>1</sup>, Frédéric Barras<sup>3</sup>, William B. Whitman<sup>2</sup>, Marc Fontecave<sup>1</sup>, Béatrice Golinelli-Pimpaneau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, UMR 8229 CNRS, Collège de France, Sorbonne Université, 11 Place Marcelin Berthelot, 75231 Paris cedex 05, France

<sup>2</sup> Department of Microbiology, University of Georgia, Athens, GA30602, Etats Unis

<sup>3</sup> Stress Adaptation and Metabolism in Enterobacteria Unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 6047, Paris, France

<sup>4</sup> Evolutionary Biology of the Microbial Cell Unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 6047, Paris, France

<sup>5</sup> IR CNRS Renard, Chimie-ParisTech, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

<sup>6</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

\*corresponding author

### Abstract

L-cysteine desulfidase CyuA catalyzes the decomposition of L-cysteine into hydrogenosulfide and 2-aminoacrylate, which is rapidly converted into pyruvate and ammonia. Phylogenetic analysis indicates that CyuA belongs to the same protein family as [4Fe-4S]-dependent L-serine dehydratases. CyuA is mostly present in Bacteria and in strictly or facultative anaerobic microorganisms. Contrary to a previous hypothesis, the phylogeny of CyuA indicates a bacterial origin and later acquisitions in Archaea by horizontal gene transfers. Comparative growth experiments of the wild-type *Methanococcus maripaludis* strain and the mutant strain lacking the gene encoding CyuA show that the protein is not only important for growth in the presence of sulfide but that it also enables the archaeum to slowly grow with cysteine as the sole sulfur source. The crystal structure of *M. maripaludis* CyuA (MmCyuA) shows that it is composed of two structural domains: the N-terminal one displays a new fold, whereas the C-terminal catalytic domain shares high structural homology with the catalytic domain of [4Fe-4S]-dependent L-serine dehydratases. The spectroscopic analysis and the crystal structures of MmCyuA solved at 2.8-3.1 Å resolution show that MmCyuA can bind a [4Fe-4S] cluster. A mechanism is proposed for the desulfuration of cysteine, analogous to that of [4Fe-4S]-dependent serine dehydratase and thiouracil desulfidase TudS, which involves the formation of an intermediate [4Fe-5S] species. Moreover, MmCyuA appears to transfer the cluster-bound sulfur atom

to [4Fe-4S]-dependent tRNA sulfuration enzymes since the MmCyuA/cysteine system can replace inorganic sulfide as a sulfur source for these reactions.

### **Significance statement**

Sulfur-containing compounds such as L-cysteine and sulfide are essential reactive metabolites. Their intracellular concentration needs to be tightly controlled for proper cellular metabolism. In the anaerobic archaeum *Methanococcus maripaludis*, which lacks a pyridoxal-phosphate-dependent L-cysteine desulfurase, L-cysteine desulfidase MmCyuA contributes to this control by supplying sulfur to the cell under low sulfide conditions. MmCyuA can bind a [4Fe-4S] cluster chelated by four cysteines, among which three are conserved. The crystal structures, together with site-directed mutagenesis, allow us to propose that Glu25 plays the role of a base abstracting the C $\alpha$  proton of the cysteine substrate. The main function of MmCyuA could be to transfer the sulfur atom mobilized from cysteine to downstream acceptors along the biosynthetic pathways of sulfurated compounds.

**Keywords:** cysteine, [4Fe-4S] cluster, cysteine desulfidase, sulfur metabolism, sulfide

## Introduction

Sulfur-containing molecules are widely distributed in nature and participate in essential biochemical reactions (1). All organisms must therefore acquire sulfur from their environment for proper cellular function. In plants and many microorganisms, inorganic sulfate, the most abundant source of utilizable sulfur in the aerobic biosphere, is taken up and reduced to sulfide, which is then incorporated into L-cysteine (2, 3). L-Cysteine, in turn, is used for redox homeostasis, protein biosynthesis and serves as the primary source of reduced sulfur for the biogenesis of L-methionine and sulfur-containing cofactors such as biotin, lipoate, thiamin, molybdopterin, coenzyme A (4-6), as well as [Fe-S] clusters (7-10) and thionucleosides present within transfer RNA (tRNA) (11).

Sulfur mobilization from L-cysteine for biosynthesis of sulfur-containing cofactors (6) or nucleosides (5, 11), is catalyzed by various classes of pyridoxal-phosphate (PLP)-dependent L-cysteine desulfurases (6, 12, 13). The first step, which generates a persulfide attached to a catalytic cysteine of the enzyme, is followed by a complex network of sulfur-transfer reactions, in which the sulfur atom of this persulfide is transferred to other sulfur-acceptor proteins. By comparison to bacterial and eukaryotic sulfur metabolism, other processes, less well-understood, are used in archaea (14). First, whereas most organisms incorporate cysteine into proteins via the biosynthesis of free cysteine, catalyzed by cysteine synthase, and then Cys-tRNA<sup>Cys</sup> formation using cysteinyl-tRNA synthetase, certain methanogenic archaea that live in an environment containing a high level of sulfide use a tRNA-dependent pathway, in which tRNA<sup>Cys</sup> is first acylated with phosphoserine (Sep) by O-phosphoseryl-tRNA synthetase, and then Sep-tRNA<sup>Cys</sup> is converted into Cys-tRNA<sup>Cys</sup> by sulfur incorporation catalyzed by Sep-tRNA:Cys-tRNA synthase (15, 16). Second, genes coding for L-cysteine desulfurase are absent in several archaea, including any methanogens (17, 18), even though activities of sulfur mobilization from cysteine were detected (17). Third, when a *Methanococcus maripaludis* cysteine auxotrophic strain was grown with 1.5 mM <sup>34</sup>S-labeled sulfide and 3.0 mM unlabeled cysteine, ~90% of the methionine and [Fe-S] clusters were labeled, suggesting that the sulfur in these compounds was derived predominantly from exogenous sulfide instead of cysteine (17). Thus, it was proposed that cysteine is not an intermediate for methionine biosynthesis and [Fe-S] cluster biogenesis in this organism and that inorganic sulfide, which is abundant in the medium, is the major sulfur source (17).

However, in 2005, Tchong et al. identified a novel enzyme for desulfurization of cysteine in *Methanococcus jannaschii*, a [4Fe-4S]-dependent L-cysteine desulfidase, which catalyzes the breakdown of L-cysteine into sulfide, ammonia and pyruvate (19), raising the possibility for this enzyme to participate into sulfur metabolism, at least under certain growth conditions. Indeed, such a cysteine desulfidase activity could account for the ~10% unlabeled [Fe-S] clusters and methionine produced in the *M. maripaludis* cysteine auxotrophic strain grown with <sup>34</sup>S-sulfide and unlabeled cysteine, and for the observed release of free sulfur from cysteine and the label dilution during



experiments using  $^{34}\text{S}$ -labeled sulfide (17). This low activity is consistent with the low levels of transcription and expression of cysteine desulfidase in this organism under normal growth conditions (20, 21) (Table S1).

L-cysteine desulfidases have recently been identified in several other organisms including *Escherichia coli* (22-24), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (25), *Moorella thermoacetica* (26), the fish pathogen *Yersinia ruckeri* (27), and the gastrointestinal pathogen *Clostridium difficile* (28), and were designed by various names (CyuA, YrbO, CdsB, YhaM, Csd). Here we call this enzyme CyuA (for cysteine utlization A) (25)). Prior phylogenetic analysis has shown that CyuA homologs are present in obligate and facultative anaerobes, suggesting an anaerobic function (19, 25, 27). The physiological role of CyuA on the cellular metabolism has been studied in various bacteria, *E. coli* (22, 23, 25), *C. difficile* (28), *S. enterica* (25) and *Y. ruckeri* (27), in which the gene is expressed in the presence of exogenous cysteine (23, 25-28). However, there was no unified conclusion from these studies since the enzyme could serve for such different functions as cysteine detoxification (22), cysteine utilization as a source of carbon/nitrogen/energy (24, 26) or as a factor of virulence for *C. difficile* (28) and *Y. ruckeri* (27).

To understand how organisms such as *M. maripaludis*, which is a strictly anaerobic methanogenic archaeon that is common in salt water marshes (29, 30), cope with the absence of a PLP-dependent L-cysteine desulfurase, we investigated here the phylogenetic distribution, physiological importance, biochemistry and structure of L-cysteine desulfidase from *M. maripaludis* (MmCyuA). We report here the first crystallographic data on a cysteine desulfidase and show that this [4Fe-4S]-dependent enzyme has the potential to mobilize sulfur from L-cysteine to support tRNA thiolation. Moreover, our results show that MmCyuA has an important role for cellular growth and allow us to propose a catalytic mechanism for this enzyme involved in sulfur metabolism.

### **CyuA emerged from Bacteria and is restrained to specific organisms**

To assess the taxonomic distribution of CyuA and depict its evolutionary history, we first identified the CyuA homologues in a large database encompassing more than 10,000 prokaryotic proteomes, assembled in a previous analysis (8). CyuA is homologous to the [4Fe-4S]-dependent serine dehydratases SdaA/B (31), but it also presents distant homology with methyl-accepting chemotaxis proteins. The distribution of CyuA is uneven in prokaryotes (Figure 1A). In Bacteria, CyuA is mostly present in *Terrabacteria*, one of the two major bacterial clades (notably in *Wallbacteria/Rifflebacteria*, *Bacillota*, *Synergistota*, *Thermotogota*), and less common in the other clade of *Gracilicutes* (*Spirochaetota*, *Schekmanbacteria*, *Deferribacterota*, *Pseudomonadata*, ...). In Archaea, it is only found in *Methanococcales* and some *Methanocellales*, *Methanobacteriales*, *Lokiarchaeota* and *Woesarchaeota*. A phylogeny based on a subsample of homologues and rooted using L-serine dehydratase as an outgroup shows that archaeal sequences are scattered within bacterial sequences (Figure 1B). The *Terrabacteria* are predominant and their sequences from a same phylum are

clustered, compared to *Gracilicutes*. Altogether, these results suggest that CyuA emerged in *Terrabacteria* and has been horizontally transferred to some *Gracilicutes* and Archaea.

Next, we wondered if the presence of CyuA could be related to specific environmental niches. We first investigated aerobia/anaerobia characteristics using the presence of superoxide dismutase (SOD) as a proxy of aerobic species (Figure S1A). We found that most organisms possessing CyuA do not have the SOD (660/1192 with the full database, 32/51 with the homogeneous sampling) and a number of taxa possessing both (*Bacteroidetes*, *Burkholderiales*, *Thermodesulfobacteria*, *Shewanella*, *Clostridiales*, ...) are in fact anaerobic. The study of the habitat of organisms encoding CyuA revealed a predominance of host-associated niches (particularly the animal gut, Figure S1B). The other habitats are shared between free-living natural niches (particularly deep biosphere, hydrothermal, marine, soil) and engineered niches (anthropogenic and designed for microbial growth). Altogether, this suggests that the presence of CyuA is related to an anaerobic way of life.

#### **Deletion of the gene encoding CyuA reduces growth of *M. maripaludis***

Methanococcales organisms live in an environment containing a high level of sulfide and a low intracellular cysteine concentration of  $\sim 20 \mu\text{M}$  (17), and they are usually cultivated in the presence of 3–5 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ , with formate or a mixture of  $\text{H}_2$  plus  $\text{CO}_2$  serving as the carbon source (30). To examine the biological significance of CyuA, the encoding *mmp1468* gene was deleted in *M. maripaludis*, and the growth of the wild-type *M. maripaludis* S2 and the  $\Delta\text{mmp1468}$  deletion mutant were compared with optimal (2.0 mM), or limiting (0.4 mM) concentrations of  $\text{Na}_2\text{S}$  (29, 30). The wild-type *M. maripaludis* S2 strain showed distinct growth advantages over the  $\Delta\text{mmp1468}$  deletion mutant when grown in rich formate medium, with optimal (2.0 mM), or limiting (0.4 mM) concentrations of  $\text{Na}_2\text{S}$ , in terms of growth rate, cell yield, and lag time (Figure 2A, Table S2). For instance, in the presence of 2.0 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  alone, the S2 strain had an average growth rate of  $0.32 \text{ h}^{-1}$  (2.2 h doubling time), reached a final optical density (OD) of around 1, and had a lag time of 19 h. Under the same conditions,  $\Delta\text{mmp1468}$  had a growth rate of  $0.23 \text{ h}^{-1}$  (3 h doubling time), reached a final OD of about 0.82, and had a lag time of 26 h (Figure 2A, Table S2). Both the wild-type and mutant strains grew poorly with 0.4 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ , but the growth difference between the two strains was also very clear (Figure 2A, Table S2).

#### **MmCyuA protects *M. maripaludis* against growth inhibition by high concentrations of cysteine**

The addition of cysteine to the sulfide-containing medium inhibited growth of the wild-type S2 strain (Figure 2B). Although minimal changes in the growth parameters were observed at 1 mM cysteine, increasing the concentration of cysteine to 5 or 10 mM decreased the growth rate and increased the lag time (Figure 2B, Table S2). The effect was exacerbated by reducing the concentration of  $\text{Na}_2\text{S}$  from 2.0 to 0.4 mM, for which growth was almost completely abolished. With 2.0 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ , 10 mM cysteine decreased the growth rate to  $0.16 \text{ h}^{-1}$  and increased the lag time to 42 h but the cell yield was

similar (Table S2). A similar trend was found with 0.4 mM Na<sub>2</sub>S. The inhibition by cysteine of the  $\Delta mmp1468$  strain growth followed a similar pattern to that of the S2 strain but was more severe (Figure 2B, Table S1), indicating that MmCyuA protects *M. maripaludis* against growth inhibition by cysteine. As concentrations of cysteine increased, in the presence of 2.0 mM Na<sub>2</sub>S, the  $\Delta mmp1468$  strain showed a commensurate decrease in growth rate and cell yield together with an increase in lag time.

### **MmCyuA is essential for cysteine utilization by *M. maripaludis***

Since in all studied organisms, CyuA is induced in the presence of exogenous cysteine (23, 25-28), we then wondered whether L-cysteine could be used as the sole sulfur source for cellular growth. Since both the wild-type and mutant failed to grow with 10 mM cysteine as the sole sulfur source using a low inoculum, a high inoculum was examined at limiting sulfide concentrations (0.1 mM) or with cysteine (1 to 10 mM) being used as the sole sulfur source (Figure 2C). When strain S2 was grown with 5 or 10 mM cysteine, in the absence of sulfide, the absorbance increased to 0.30 after a 21-day lag with a doubling time of 19 h, and to 0.38 after a 10-day lag with a doubling time of 26 h, respectively (Figure 2C). In contrast, the lag time was less than ~18 h when sulfide was used as the sole sulfur source (Table S2). Thus, although strain S2 could utilize cysteine as the sole sulfur source, growth was very slow and cysteine was inhibitory at high concentrations. Importantly, MmCyuA is essential for cysteine utilization since cysteine did not support even slow growth of the  $\Delta mmp1468$  mutant in the absence of sulfide (Figure 2C). Altogether, these results indicate that MmCyuA is essential for cellular growth of *M. maripaludis* both in the presence and absence of sulfide.

### **MmCyuA can bind a [4Fe-4S] cluster**

MmCyuA was overexpressed in *Escherichia coli* with an N-terminal histidine tag, and purified under aerobic conditions using nickel affinity chromatography. The tag was then removed using the H3C protease and the protein was further purified by size-exclusion chromatography (Figures S2A & S2B). The ‘as-purified’ MmCyuA protein possessed a brownish color associated with a UV-visible spectrum exhibiting bands around 320, 410 and 460 nm, characteristic of a [2Fe-2S] cluster (Figure S2C). Quantification of iron and sulfur contents gave  $1.1 \pm 0.2$  mol Fe and  $1.2 \pm 0.2$  mol S per monomer. After treatment with dithionite and EDTA to remove the residual cluster (Figure S2C), SEC-MALS analysis of ‘apo-MmCyuA’ thus obtained indicates that it is mainly a dimer (Figure S2D). The cluster was then reconstituted anaerobically by treating the protein with a 5-molar excess of ferrous iron and sodium sulfide. The protein was then purified on a Superdex 200 gel filtration column (Figures S3A & S3B), also under anaerobic conditions, leading to a homogenous brownish protein containing a [Fe-S] cluster that was subsequently called holo-MmCyuA. SEC-MALS analysis of holo-MmCyuA, using the correction for samples that absorb the laser light of the SEC-MALS device (32), indicates that it is a dimer (measured molar mass of  $80.8 \pm 2.1$  kDa) (Figure S3C).

Quantification of the protein-bound iron and sulfur content gave  $3.8 \pm 0.2$  Fe and  $3.4 \pm 0.3$  S per holo-MmCyuA monomer, consistent with the presence of one [4Fe-4S] cluster per monomer. Accordingly, the UV-visible spectrum of purified holo-MmCyuA displays a broad absorption band at around 400 nm that is characteristic of the presence of a [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster (Figures S2C and S4A). Addition of dithionite to holo-MmCyuA led to a rapid decrease of the intensity of the 400 nm absorption band, suggesting a fast reduction of the cluster (Figure S4A). The cluster in the protein after cluster reconstitution and reduction to [4Fe-4S]<sup>+</sup> was further analyzed by EPR spectroscopy (Figure S4B). Holo-MmCyuA was EPR silent, in agreement a cluster in a S=0 state and excluding the presence of S=1/2 paramagnetic clusters such as [4Fe-4S]<sup>+</sup> or [3Fe-4S]<sup>+</sup>. Upon reduction with dithionite, the EPR spectrum exhibited an axial signal characteristic of a S=1/2 [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster with  $g_{\parallel}=2.03$  and  $g_{\infty}=1.93$ .

### **The [4Fe-4S] cluster is required for cysteine desulfidase activity**

The cysteine desulfidase activity of MmCyuA was assayed in the presence of L-cysteine by monitoring pyruvate formation after derivatizing with 2,4-dinitrophenylhydrazine using visible spectroscopy, as reported (33). The cluster was required for catalysis since only holo-MmCyuA, not apo-MmCyuA, exhibited catalytic activity (Figure 3A). Na<sub>2</sub>S (up to 5 mM) did not decrease the pyruvate formation rate, indicating that product inhibition was not significant (Figure 3B). Mg<sup>2+</sup>, which was included in the activity test of MjCyuA (19), was found to be not necessary for cysteine desulfidase activity. Dithiothreitol (DTT) was an inhibitor since 5 mM DTT decreased the activity by about 40% (Figure 3B) and was thus omitted in subsequent assays. The kinetic constants for cysteine were  $K_m=0.25$  mM,  $k_{cat}=2.7$  s<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_m=10.8$  mM.s<sup>-1</sup> and for selenocysteine  $K_m$  of 0.21 mM,  $k_{cat}=1.9$  s<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_m$  of 7.7 mM.s<sup>-1</sup> (Figures S5A & S5B). L-homocysteine was not a substrate (Figure 3B) and L-serine behaved as a competitive inhibitor of holo-MmCyuA with an inhibition constant  $K_i$  of 0.11 mM (Figures S5C and S5D).

### **The L-cysteine / MmCyuA system provides the sulfur source for several [4Fe-4S]-dependent tRNA sulfuration enzymes *in vitro***

To know whether cysteine/MmCyuA could provide sulfur for tRNA thiolation, we tested the activity of U34-tRNA thiolase NcsA and U8-tRNA thiolase TtuI from *M. maripaludis* (34, 35), named MmNcsA and MmTtuI, respectively, in the presence of either inorganic sulfide or cysteine/MmCyuA (Figure S6). This experiment confirmed that the [4Fe-4S] clusters of MmNcsA and MmTtuI are absolutely required for activity and that sulfide is functional as a sulfur source for tRNA thiolation catalyzed by these enzymes, as reported (34, 35). Remarkably, in the absence of sulfide, the Cys/MmCyuA system nicely supports tRNA thiolation, with the [4Fe-4S] cluster of MmCyuA being absolutely essential.

### **Overall crystal structure of holo-MmCyuA**

Holo-MmCyuA was crystallized under anaerobic conditions within a glove box. Two types of crystals were obtained (Table 1). Crystals belonged to space group  $P2_12_12_1$ , with two molecules in the asymmetric unit and diffracted to 2.6-2.9 Å resolution (Table 1). Initially, an anomalous map at 5 Å resolution, obtained from data collected at the iron edge, allowed the positioning of two [Fe-S] clusters in the asymmetric unit but this did not lead to successful tracing of the polypeptide chain (data not shown). Using the closest homologue of MmCyuA in the Protein Data Bank (PDB), L-serine dehydratase from *Legionella pneumophila* called LpLSD (12.4 % sequence identity with MmCyuA; Figure S7A), only the C-terminal domain (17.0 % sequence identity) could be positioned by molecular replacement. The structure was finally solved when the protein structure prediction program AlphaFold was released in 2021 (36), by molecular replacement with PHASER, using the AlphaFold model of MjCyuA (52.8 % sequence identity, Figure S7A).

A dimer is formed by the two molecules in the asymmetric unit (Figure 4A), with the interface provided by hydrophobic residues (Figure S8A). Analysis of the contacts between the two monomers with the 'Protein interfaces, surfaces and assemblies' (PISA) software (37) indicates that this packing, with a buried surface area of 3680 Å<sup>2</sup>, corresponds to the dimer in solution. Each monomer in the asymmetric unit is constituted by a N-terminal structural domain (residues 24-149), formed by a central antiparallel β-sheet surrounded by α-helices, and a mostly helical C-terminal structural domain (residues 153-378) (Figure S8B). The two domains are connected by a linker (residues 150-152) that could not be traced due to the absence of electron density. Interestingly, the N-terminal extremity of MmCyuA belongs to the C-terminal structural domain, because of the formation of an antiparallel β-sheet between strand β1 (residues 17-21) and strand β9 (residues 230–234). The two monomers are nearly identical to each other (Figure S8C).

### **The [4Fe-4S] cluster is bound by four cysteines**

In the crystal of holo-MmCyuA crystallized in the absence of ligand, the anomalous maps from data recorded at the iron K-edge energy indicated that one [Fe-S] cluster is bound to each molecule in the asymmetric unit (Figures S9A and S9B). In both molecules, the electron density was best fitted by one [4Fe-4S] cluster with a 70% occupancy, coordinated by four cysteines (Cys287, Cys289, Cys329 and Cys336) (Figures S9C & S9D). Among these, Cys287, Cys329 and Cys336 are strictly conserved (Figure S7B), with Cys287 and Cys329 belonging to flexible loops. Indeed, residues A283-A286 and B283-B286 were not modeled due to the absence of electron density. Intriguingly, the nonconserved residue Cys289 was also a ligand of the cluster. In both molecules, besides the cysteines that coordinate the cluster, the closest neighbours to the cluster are Asn239, Lys339, Glu25 and a sulfate ion, which locates an anion binding site (Figure 4B). The sulfate ion forms ionic interactions with Arg223 and hydrogen bonds with the SH group of Cys23 and to the side chain and main chain

nitrogen atoms of Asn239 (Figure 4B).

### **Crystal structure of the [2Fe-2S]-containing-MmCyuA in complex with MES**

The crystal structure of holo-MmCyuA co-crystallized with 2 mM serine also possessed two molecules in the asymmetric unit, which are very similar (Figure S10A). The anomalous maps from data recorded at the iron K-edge energy were best fitted with a [2Fe-2S] cluster bound to the four cysteines (Cys287, Cys289, Cys289 and Cys329) (Figures S10B and S10C). An electron density was observed near the cluster but it did not fit well with a serine molecule and was instead attributed to 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) coming from the buffer in molecule A (Figure S10D) and to a chloride ion in molecule B (Figure S10E). The presence of two different ligands at the active sites of the two molecules results in different positioning of the clusters (Figure S10E). The sulfonate group of MES and the chloride ion are located at the anion binding site occupied by the sulfate ion in the holo-MmCyuA structure.

### **Cys23 and Glu25 of MmCyuA are residues critical for catalysis**

The holo-MmCyuA structure shows that, among the residues located in the active site, the strictly conserved residue Glu25 is the best candidate to play a role as a base in catalysis (Figure S7B). Cys23, located near the anion site could also play a role in catalysis but it is not strictly conserved since it is replaced by a valine, a serine or is absent in some CyuA sequences (Figure S7B and Figure 1B).

To examine the function of residues Cys23 and Glu25, these residues were mutated to alanine and glutamine, respectively. Whereas the E25Q mutant could not be expressed (Figure S11A), the C23A mutant was purified (Figure S3A & S13B) and reconstituted with a [Fe-S] cluster (Figures S11C and S11D). The holo-Cys23Ala mutant was completely inactive (Figure 3A), indicating an important role for this residue in catalysis.

### **The C-terminal domain of MmCyuA displays strong structural similarity with the catalytic domain of serine dehydratases.**

Analysis of the MmCyuA crystal structure with DALI (Distance matrix alignment) (38) indicated that the protein with known crystal structure that has the highest structural similarity is LpLSD (39)(PDB code 4RQO, Figure 5)(Z-score of 23.5, rmsd=3.8 Å for 324 aligned C $\alpha$ s), despite the low sequence identity between the two proteins (17%; Figure S7A). The dimeric interface of MmCyuA and LpLSD is also conserved (Figure 5A).

Interestingly, the C-terminal catalytic domain of MmCyuA is not only structurally similar to that of serine dehydratase (Z-score of 12.6, rmsd=2.5 Å for 155 aligned C $\alpha$ s; Figure 5B) but also to the catalytic domains of cis-aconitate decarboxylase (Z-score of 13.5, rmsd=2.6 Å for 155 aligned C $\alpha$ s, PDB code 7BR9) (40) and iminodisuccinate epimerase (Z-score of 13.0, rmsd=2.3 Å for 153 aligned

C $\alpha$ s, PDB code 2HP3) (41)), two enzymes that function without any cofactor, for which a two-base mechanism has been proposed. The LpLSD crystal structure showed that all four iron atoms of the [4Fe-4S] cluster were coordinated with protein cysteinyl residues, the three conserved cysteines and the C-terminal cysteine acting as the fourth ligand (Figure 5B) (42). It was proposed that this buried state of the cluster mimicked a precatalytic conformation of the enzyme. The superposition of the active sites of MmCyuA and LpLSD shows that His61 is located in a similar position as Glu25 in MmCyuA, whereas there is no equivalent to Cys23 of MmCyuA in LpLSD (Figure 5B). Mutation of His61 to alanine in LpLSD resulted in a complete loss of catalytic activity, which led the authors to suggest that His61 may serve as the catalytic base required for abstracting the C $\alpha$  proton of the serine substrate (39). Similarly, Glu25 could act as a general base to deprotonate the C $\alpha$  atom of the cysteine substrate.

## Discussion

### **CyuA originates from Bacteria and has been widely transferred**

The phylogeny and the taxonomic distribution of CyuA in Prokaryotes indicates that this protein likely emerged within *Terrabacteria* and has been further horizontally transferred to some *Gracilicutes* and Archaea. This is in contradiction to recent hypotheses that CyuA would have been present in the Last Universal Common Ancestor (25). Thus, our results challenge the view that the presence of CyuA is an ancestral trait and highlight the importance of a sufficient coverage of the diversity when performing such analyses. Our investigation further indicated that most of organisms possessing CyuA are anaerobes and have been isolated/sequenced from animal guts, aquatic environment and engineered environments. Together with the fact that CyuA has been widely transferred and is spottily distributed, this suggests that the presence of CyuA is not a conserved feature but is conditioned to specific environments. This could be due either to the presence of specific nutrients more abundant in anaerobic environments like peculiar forms of sulfur, or to the co-presence of specific anaerobic metabolisms or to sensitivity to oxidative stress.

### **MmCyuA, although not essential for growth, confers a growth advantage to *M. maripaludis* under low sulfide conditions or when cysteine is used as the sole sulfur source**

The requirement for high concentrations of Na<sub>2</sub>S for optimal growth was consistent with the assumed high levels of sulfide found in tidal marshes, the environment where this strain was isolated, which distinguishes the methanococci from other methanogens (29). The relatively poor growth of the mutant, in the presence of both low and high levels of sulfide, suggests that MmCyuA plays an important role in metabolism even when sulfide is abundant. Previous experiments indicated that cysteine is not a major sulfur source in *M. maripaludis* but did not eliminate cysteine as a secondary minor source (17). While MmCyuA allowed *M. maripaludis* to utilize cysteine as the sole source of

sulfur, growth was so slow that it was only apparent with a 100-fold increase in the inoculum to produce sufficient biomass. MmCyuA also protected *M. maripaludis* from cysteine toxicity, especially at low sulfide concentrations. Altogether, our results indicate that MmCyuA plays an important role in sulfur homeostasis, possibly regulating the cysteine levels in cells. Possibly, CyuA is a component of a thioredoxin-dependent redox regulatory system, such as documented in the related methanogen *M. jannaschii* (43).

The *cyuA* gene also allowed *E. coli* and *S. enterica* to grow in the presence of cysteine as the sole carbon source (23, 25). Similar to the growth results of *M. maripaludis*, when 10 mM cysteine was supplied to *E. coli* cells, a very long (40 h) growth lag was followed by successful outgrowth. It was proposed that this lag was due to inhibition of the cell metabolism due to the very high concentration of cysteine, since this lag phase was eliminated by preculturing cells with pyruvate and 1 mM cysteine (24). This brief impairment of growth upon exposure to a high concentration of cysteine, which was also observed in *S. enterica*, is consistent with the induction of a defensive response (24, 25). Similarly, cysteine desulfidase enhanced the tolerance of *C. difficile* to L-cysteine (28).

In contrast,  $\Delta cyuA$  mutants exhibited greater sensitivity to cysteine and no adaptation.

### **CyuA is a [4Fe-4S]-dependent enzyme**

Here, we report the purification of holo-MmCyuA after cluster reconstitution, which enabled the first spectroscopic and structural characterization of this enzyme. After purification under aerobic conditions, as-purified MmCyuA behaved as a dimer, with each monomer containing a [2Fe-2S] cluster, a state of the cluster previously observed for several other [4Fe-4S]-dependent proteins when purified aerobically (Bouvier). Yet, since the cluster was observed in the [2Fe-2S] state in one of the crystal forms, the hypothesis that the [2Fe-2S] state could have a physiological importance cannot be eliminated.

Nevertheless, we showed that, after anaerobic cluster reconstitution, MmCyuA binds a [4Fe-4S] cluster that was essential for activity. Moreover, cysteine and selenocysteine were specific substrates of MmCyuA, with kinetic constants of  $K_m=0.25$  mM,  $k_{cat}=2.7$  s<sup>-1</sup> at 37°C for cysteine, and serine was a competitive inhibitor with a  $K_i$  of 0.11 mM. Since selenocysteine is abundant in methanococci and key amino acid residue in some essential proteins, the CyuA activity with selenocysteine could be a physiologically important activity.

It is interesting to compare MmCyuA with CyuA from *M. jannaschii*, called MjCyuA, which had previously been produced as a recombinant protein in *E. coli* (19). After aerobic purification, MjCyuA contained an inactive [3Fe-4S]<sup>+</sup> cluster, with an Fe content of 2.7 mole per subunit, and it was presumed to be a trimer (19). The holo-MjCyuA protein had not been purified and characterized, and, for measuring the catalytic activity, the air-inactivated enzyme with a [3Fe-4S] cluster was converted into the active [4Fe-4S] cluster directly in the assay mixture containing L-cysteine, ferrous ions, and DTT. The enzyme was less specific for L-cysteine than MmCyuA, with kinetic parameters  $K_m=1.8$



mM,  $k_{\text{cat}}=39.6 \text{ s}^{-1}$  at  $65^{\circ}\text{C}$ . To test the functional importance of the three strictly conserved cysteines (Cys282, Cys322 and Cys329) (Figure S7B), these residues were mutated to alanine or serine. The C282A, C322S and C329S mutants were shown to retain only 5-12% activity of the wild-type enzyme whereas the C322A-C329A mutant was completely inactive, in agreement with Cys282, Cys322 and Cys329 being the ligands of the [4Fe-4S]-cluster (19). Our crystal structures of holo-MmCyuA confirm that the [4Fe-4S] cluster is bound by the three strictly conserved cysteines, but also to a nonconserved cysteine. Nevertheless, it is presumed that, in the catalytically active state, the [4Fe-4S] cluster would be bound to the three conserved cysteines only (19).

### **[4Fe-4S]-dependent cysteine desulfidases are closely related to [4Fe-4S]-dependent serine dehydratases**

[LpLSD is the closest homologue of MmCyuA in the PDB (Figure S7A). This structural homology is in agreement with the close phylogenetic relationship between the two enzyme families (Figure 1B), likely due to the chemical similarity of the two reactions: cysteine desulfidation is analogous to serine dehydration, with the removal of  $\text{H}_2\text{S}$  (CyuA) instead of  $\text{H}_2\text{O}$  (LSD). Moreover, the catalytic mechanisms of both enzymes are likely very similar since both reactions are dependent on a [4Fe-4S] cluster. The LpLSD crystal structure showed that all four iron atoms of the cluster are coordinated with protein cysteinyl residues, the three conserved cysteines (Figure S7A) and the C-terminal cysteine, which acted as the fourth ligand and exhibited the same orientation as expected for the L-serine substrate. The insertion of the C-terminal segment of the protein into the active-site cleft led to the complete burial of the cluster. Since the cluster needs to be exposed to solvent to bind the substrate, it was concluded that this structure represented a non-active, precatalytic conformation of the enzyme. This was confirmed by studying the conformational changes of apo- and holo-LpLSD in solution using hydrogen-deuterium exchange combined with mass spectrometry (42). The burial of the cluster by the C-terminus upon [4Fe-4S] cluster binding was in agreement with a high resistance of the cluster to oxygen-induced degradation. Similarly, the binding of the [4Fe-4S] cluster of MmCyuA by four cysteines could represent the pre-catalytic state in the absence of the substrate. The superposition of the active sites of MmCyuA and LpSDH shows that His61, which likely acts as the catalytic base that abstracts the  $\text{C}\alpha$  proton of the serine substrate (39), is located in a similar position as Glu25 in MmCyuA, favoring the hypothesis that Glu25 is the catalytic base (Figure 5B).

### **Proposed catalytic mechanism for [4Fe-4S]-dependent cysteine desulfidases**

However, Cys23 of MmCyuA, which is less conserved than Glu25 and is located near the anion binding site, is another critical residue since its mutation to alanine completely inactivates the enzyme (Figure 3A). The equivalent residue, Cys25 in MjCyuA, was the site of alkylation with N-ethylmaleimide, resulting in enzyme activation, and its mutation to alanine reduced the activity to 0.4% (19). However, given that Glu25 occupies a position similar to that of His61 that is presumed to

be the catalytic base in LpLSD (Figure 5B), we favor a mechanism for the desulfidation reaction that involves Glu25 as the catalytic base (Figure 6). First, displacement of nonconserved Cys289 from the fourth Fe atom of the cluster would enable coordination of the thiol group of the cysteine substrate, followed by the deprotonation of the thiol group by Glu25 to lead to the formation of 2-amino-acrylate and a [4Fe-5S] species. Such a [4Fe-5S] cluster has previously been observed in the desulfidation of 4-thiouracil by the [4Fe-4S]-dependent thiouracil desulfidase TudS (44, 45). The sulfide-bound cluster could be given to downstream acceptors along the biosynthetic pathways of sulfurated compounds. The 2-aminoacrylate would finally tautomerize into 2-iminopropionic acid, with hydrolysis of the latter giving rise to the final products ammonia and pyruvate.

This model of the cysteine desulfidase reaction, with the [4Fe-4S] cluster acting as a Lewis acid (46), is in full agreement with the mechanism previously proposed for MjCyuA (19) but also for [4Fe-4S]-dependent L-serine dehydratases (31, 39, 47), which produce the same final products as MmCyuA, ammonia and pyruvate.

## Conclusion

Cysteine is a central compound involved in many cellular processes, including sulfur metabolism. In most organisms, it is the substrate of L-cysteine desulfurase, which provides sulfur in the first step of [Fe-S] cluster biogenesis. Methanococci were shown to possess 15-fold higher amounts of [Fe-S] clusters than aerobically grown *E. coli* (17), but they do not contain homologs to the *nifS/iscS/sufS* genes encoding cysteine desulfurase (7). Two opposing hypotheses have been proposed for providing sulfur for [Fe-S] cluster biosynthesis in these organisms. First, inorganic sulfide could be used directly (17). Indeed, it is acknowledged that [Fe-S] clusters in proteins can be spontaneously assembled from ferric ion, thiol and sulfide under proper conditions, but this would most likely be an inefficient process *in vivo* (48). The second possibility was that CyuA might be involved in the generation of cluster-bound hydrogenosulfide, which could be transferred to acceptor proteins (19), in a similar way as the transport of sulfur through persulfides by PLP-dependent cysteine desulfurases in prokaryotes and eukaryotes. This second hypothesis would give a role for CyuA, which appears to have an important function *in vivo*.

Our work suggests that the [4Fe-5S] species is an essential intermediate in the biosynthetic pathway of sulfurated compounds. The SH group attached to the cluster may also be transferred and used for sulfhydration of residues of target proteins (49), an important process since the dynamic nature of sulfhydration may influence stress responses (50). Free sulfide would bind to the [4Fe-4S] cluster under high sulfide conditions while cysteine could be used as alternate sulfur donor to the cluster, through the [4Fe-4S]-dependent desulfidase reaction, when the concentration of sulfide is low.

## Material and methods

### Phylogenetic analysis

We used the protein database assembled in Garcia et al 2022 (8) that covers the diversity of prokaryotes. Briefly, the genomes were downloaded from NCBI and several rounds of sampling have been performed, based on taxonomic redundancy, whole genome comparison, taxonomic clustering and similarity-based clustering using RpoB as a marker. The representative genomes have been selected using quality/reference indicators: the number of proteins annotated as reviewed in Uniprot, the NCBI completeness status, the NCBI representative status, and the availability of annotation files. The final database encompasses 9,596 bacterial proteomes and 1,268 archaeal proteomes. We also used the same taxonomic subsampling of 551 proteomes used in Garcia et al 2022 (8). It encompasses a number of proteomes per phylum/major clade of the same order and thus corresponds to a homogeneous sampling.

We identified the homologues of CyuA using iterative BLASTP v2.8.1+ (51) with an e-value threshold of  $1e^{-4}$ . Then, we built aligned sequences using MAFFT v7.419 (52) (auto option) and built an HMM profile using HMMER v3.2.1 (53) (hmmbuild). We performed a HMMsearch using this profile on the database and filtered using 0.01 as an e-value threshold. Sequences have been realigned and the alignment has been manually refined. A preliminary phylogeny has been inferred using FASTTREE (54) v2.1.10 (LG+G4) and has been used to delineate the CyuA subfamily. The homologues of SOD have been identified using the same approach.

The dataset of CyuA and L-serine dehydratase have been sampled, realigned using MAFFT-linsi and trimmed by BMGE (55) v1.12 (BLOSUM30, -b 1 -w 1 -h 0.95). The phylogeny has been inferred using IQTREE v1.6.10 (56), using the best suited model according to BIC criteria (LG+R7). 1,000 replicates of ultrafast bootstraps have been computed to assess the robustness of branches. The reference phylogenies of Bacteria and Archaea of Garcia et al 2022 (8) have been used to map the taxonomic distribution of CyuA. The bacterial tree has been inferred from a concatenation of RpoB, RpoC and IF2 and the archaeal tree has been inferred from a concatenation of 30 ribosomal proteins, and for both, IQTREE has been used with mixture model (LG+C60+PMSF). The figures have been generated using iTOL (57). The ecological niches of organisms have been identified using METACAT (Garcia, unpublished).

### Deletion of the *cyuA* gene in *M. maripaludis*

The *mmp1468* gene was replaced with the *pac* (puromycin N-acetyltransferase) cassette for puromycin resistance in *M. maripaludis* S2, as described (58), resulting in the construction of the  $\Delta mmp1468::pac$  deletion mutant ( $\Delta mmp1468$ ). Primers containing the *SfiI* restriction sites, regions upstream (or UP) and downstream (or DOWN) of the target *mmp1468* gene were PCR amplified using Phusion® DNA polymerase (NEB) Phusion®, and settings were optimized for A+T rich region amplifications (59,

60) (Table S3). The RE-Marker-RE component of p5L-R was likewise amplified in parallel using the Q5® DNA Polymerase (NEB). The UP and DOWN were then ligated at the *Sfi*I sites into the RE-Marker-RE. The upstream and downstream sequences of the first and second REs are already present in the p5L-R and serve as suitable anchor sites for RE-Marker-RE PCR amplification.

### **Growth media and culture conditions**

Media were prepared in glassware cleaned with 1 M HCl to ensure removal of contaminating sulfur compounds. Unless specified differently, *M. maripaludis* was cultured in anaerobic formate medium under a gas phase of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20) as previously described (61), except that it was reduced with 3 mM DTT instead of cysteine. The stock solution of 0.5 M L-cysteine was prepared in deionized water, filter sterilized, and stored under N<sub>2</sub> gas. For most experiments, cultures of *M. maripaludis* strain S2 (wild-type) and  $\Delta mmp1468$  (the deletion mutant) were diluted to a “low” inoculum size of 10<sup>5</sup> cells per 5 mL of formate medium to minimize the contribution of possible second site mutations. Since both the wild-type and mutant failed to grow with 10 mM cysteine as the sole sulfur source with a “low” inoculum, a “high” inoculum size of 10<sup>7</sup> cells per 5 mL of formate medium was used. Cultures were then incubated at 37°C, and five replicates of each growth condition were tested. The optical density (OD) was determined at 600 nm using a Thermo Scientific™ GENESYS™ 20 Visible spectrophotometer. Uninoculated medium with the same composition served as the control. The initial zero-time absorbance of each inoculated tube was subtracted from subsequently measured absorbances for each tube to control for absorbance differences due to variations in the glassware. Growth rate throughout the time course of growth for each culture was calculated via equation 1 below. The lag time was defined as the time from inoculation for an individual culture to reach an OD of 0.1. The cell yield was determined directly from maximum OD in stationary phase.

$$\text{Equation 1: Growth Rate} = \frac{\ln(O.D._2 \div O.D._1)}{T_2 - T_1}$$

### **Heterologous gene overexpression of MmCyuA**

MmCyuA from *M. maripaludis* strain S2 (NC\_005791.1) was produced from the synthetic gene *mmp1468*, with codon optimized for expression in *E. coli* by Eurofins. Subcloning was performed into pET15b, between the NdeI and BamHI restriction sites, to add a 6-His cleavable tag at the N-terminus, which could be cleaved by the H3C protease. Competent *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the *cyuA*-containing plasmid to overexpress MmCyuA. A single colony was used to inoculate 200 mL of Luria Broth (LB) medium supplemented with ampicillin (100 µ.gmL<sup>-1</sup>). 40 mL of this preculture, grown overnight at 37°C, was then used to inoculate 4 L of the same medium. Cells were incubated at 37°C until the optical density OD<sub>600</sub> reached 0.6, and protein expression was induced at

16°C with 0.5 mM isopropyl- $\gamma$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were incubated for 18 h at 16°C, collected by centrifugation at 4,000 g (4°C) for 15 min, and stored at -80°C until use.

#### **Aerobic purification of MmCyuA**

Cells were resuspended in 25 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, containing 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNase A (Fisher), protease inhibitor cocktail (Roche, one tablet per 50 ml), 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM imidazole, and disrupted by sonication. Cells debris were removed by centrifugation at 35,000 rpm for one hour at 4°C. The supernatant was then purified by Ni-NTA affinity chromatography using 2 x 5 mL HisTrap<sup>TM</sup> FF columns (Cytiva) in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol using a linear gradient of 5-500 mM imidazole at 1.5 mL  $\text{min}^{-1}$  in 100 min. The protein was collected, dialyzed twice against 3 L of 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol in the presence of the PreScission Protease (25  $\mu\text{g}$  per mg MmCyuA). After concentration with a Vivaspin 20 ultrafiltration membrane (30 kDa cutoff, Sartorius), the protein was further purified at 1 mL  $\cdot\text{min}^{-1}$  onto a Hiload 16/60 Superdex 200 gel filtration column (Cytiva) equilibrated with 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, using an ÄKTA system. The 'as-purified' protein was concentrated to 4 mg  $\cdot\text{mL}^{-1}$  with an Amicon Ultra filter device (30 kDa cutoff), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The purity of MmCyuA was assessed along the purification steps using SDS-PAGE gels, and its concentration determined using the Bradford assay (Biorad) (62) using BSA as the standard.

The GST-3C-protease (a gift from S. Mouilleron) was expressed using pGEX-2T recombinant plasmids. After induction at 25°C with 0.1 mM IPTG for 20 h, the protein was purified using glutathione-Sepharose chromatography.

#### ***In vitro* [Fe-S] cluster reconstitution and anaerobic purification of holo-MmCyuA**

The reconstitution of the [4Fe-4S] cluster and purification of holo-MmCyuA were performed in a glove box (MBraun) containing less than 0.5 ppm  $\text{O}_2$ . After incubation of as-purified MmCyuA (100  $\mu\text{M}$ ) with 10 mM dithiothreitol for 15 min, a 5-fold molar excess of ferrous ammonium sulfate and sodium sulfide was added. Cluster reconstitution was followed by the appearance of a band at around 410 nm in the UV-visible spectrum, which was recorded with a XL-100 UVICON spectrophotometer equipped with optical fibers, and incubation was stopped when  $\text{OD}_{410}/\text{OD}_{280} > 0.3$ . After centrifugation for 30 min at 20,000 g, holo-MmCyuA was loaded onto a Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtration column (Cytiva) equilibrated in 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl. The protein was then concentrated to 10 mg  $\cdot\text{mL}^{-1}$  on a Vivaspin concentrator (30 kDa cutoff, Sartorius), frozen and stored in liquid nitrogen in sealed tubes. The Fe and S content were determined using the Beinert and Fish methods, respectively (63, 64).

### **EPR spectroscopy**

The continuous waves (CW) EPR spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS-E500 spectrometer operating at 9.3881 GHz, equipped with a SHQE cavity and a helium flow cryostat (ESR 900 Oxford instruments, under nonsaturating conditions, using microwave powers of 2 mW and 10 mW, a modulation amplitude of 0.4 mT and a modulation frequency of 100 kHz. The EPR spectra were recorded at temperatures from 20 to 40K, before and after reduction of holo-MmCyuA (200  $\mu$ M), in 25 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT, with 5 mM dithionite for 30 minutes at room temperature and freezing.

### **SEC-MALS**

Size Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS) experiments were performed using an HPLC-MALS system (Shimadzu) equipped with light scattering detector (mini-DAWN TREOS, Wyatt Technology), refractive index detector (Optilab T-rEX, Wyatt Technology) and UV detector (SPD-20A, Shimadzu). Apo- or holo-MmCyuA (100  $\mu$ L at 2 mg.mL<sup>-1</sup>) was injected on a Superdex 200 10/300 GL Increase column (Cytiva) equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT at a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. The molar mass was calculated with the ASTRA 6.1 software (Wyatt Technology) using the Forward Monitor mode to take into account the fact that the holo-protein absorbs light at the laser wavelength (32). A refractive index increment (dn/dc) value of 0.183 mL.g<sup>-1</sup> was used.

### **Cysteine desulfidase activity test.**

Apo-, holo-MmCyuA or the holo-C23A mutant (1  $\mu$ M) were incubated in the presence of 0.05-5 mM L-cysteine at 37°C for 2-30 min in 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl and the reaction was stopped by adding 1/10 (v/v) 1M HCl. The formation of the pyruvate product was measured by the absorbance at 340 nm after derivatizing with 2,4-dinitrophenylhydrazine (33). L-seleno-cysteine was prepared by reducing 40 mM L-seleno-cystine (Sigma) with 200 mM DTT in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 for 30 min (65). L-serine inhibition assays were performed using 0.05–1 mM L-serine and 0.1–1 mM L-cysteine. The pyruvate formation was first recorded for 30 min to determine the linear phase of the product formation versus time curve and measure the initial velocity ( $V_i$ ) from its slope using linear regression. The kinetic parameters,  $k_{cat}$  and  $K_m$ , for L-cysteine and L-selenocysteine, were then determined after stopping the reaction after two minutes using the  $V_i$  as a function of substrate concentration plot by nonlinear regression fitting of the Michaelis-Menten equation using the GraphPad Software (Prism version 9.0.0 for Windows, Boston, Massachusetts, USA) (66). The plots of  $V_i$  as a function of both L-serine (inhibitor) and L-cysteine (substrate) concentrations were analyzed with linear regression in GraphPad Prism.

### **Sulfur transfer assays by MmCyuA from L-cysteine to the tRNA thiolation enzymes ThiI and NcsA**

MmCyuA (apo or holo) was incubated for 1 h in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl at 37°C with MmTtuI (apo or holo) and 15  $\mu$ M tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> transcript, 1 mM ATP and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> in the presence or absence of cysteine (1 mM) or Na<sub>2</sub>S (1 mM) as the sulfur source. Preparation of tRNA transcript, tRNA digestion and analysis of modified nucleosides was carried out as described previously in (34).

### **Crystallization, X-ray data collection and processing**

All crystals of holo-CyuA at 8 mg.mL<sup>-1</sup>, in 25 mM HEPES pH 7.5, 150-200 mM NaCl, were grown anaerobically at 18°C using the hanging drop method and flash-frozen under anaerobic conditions using liquid propane after cryoprotection with 20-25% glycerol. Crystals of holo-CyuA alone (0.1 x 0.15 x 0.1 mm) were obtained by mixing 2  $\mu$ L of protein with 1  $\mu$ L of a 500  $\mu$ L reservoir solution containing 13 % PEG 4000, 0.1 M NaCl, 0.1 M tri-sodium citrate dihydrate pH 5.5, 0.1 M LiSO<sub>4</sub>, 10 % glycerol. Crystals of holo-CyuA with MES were grown by mixing 1  $\mu$ L of protein and 10 mM L-serine with 1  $\mu$ L of a 500  $\mu$ L reservoir solution containing 14 % PEG 4000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M NaCl, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>.

X-ray data were collected on a single crystal at 100K at the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France) on the PX1 and PX2 beamlines. Native (12.67 keV) and iron anomalous (7.125 keV) diffraction data were collected for holoCyuA alone crystals. Data were indexed, processed and scaled with the *autoPROC* pipeline (67) and the output from *STARANISO* was used as the mtz reflection file.

The structure of holo-MmCyuA alone was solved by molecular replacement using the *M. jannaschii* AlphaFold prediction (ID: AF-Q58431-F1) using *PHENIX-Phaser* (68). The final model was obtained by alternating manual building in *COOT* (69) and refinement in *phenix-refine* (70) (or *autoBUSTER* (71)) using NCS restraints and two TLS groups per chain using the native data collected at 12.67 keV for each crystal.

### **Acknowledgements**

We thank SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities, Pierre Legrand and Martin Savko for assistance in using beamlines PROXIMA-1 and 2, the French EPR CNRS Facility, Infrastructure de Recherche Renard (IR 3443). This work has benefited from the facilities and expertise of the Macromolecular Interaction Platform of I2BC and was supported by the French State Program ‘Investissements d’Avenir’ (Grants “LABEX DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011 and “Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases”, ANR-10-LABX-62-IBEID), the CNRS and the Institut Pasteur.

**Table 1: Data collection and refinement statistics<sup>a</sup>**

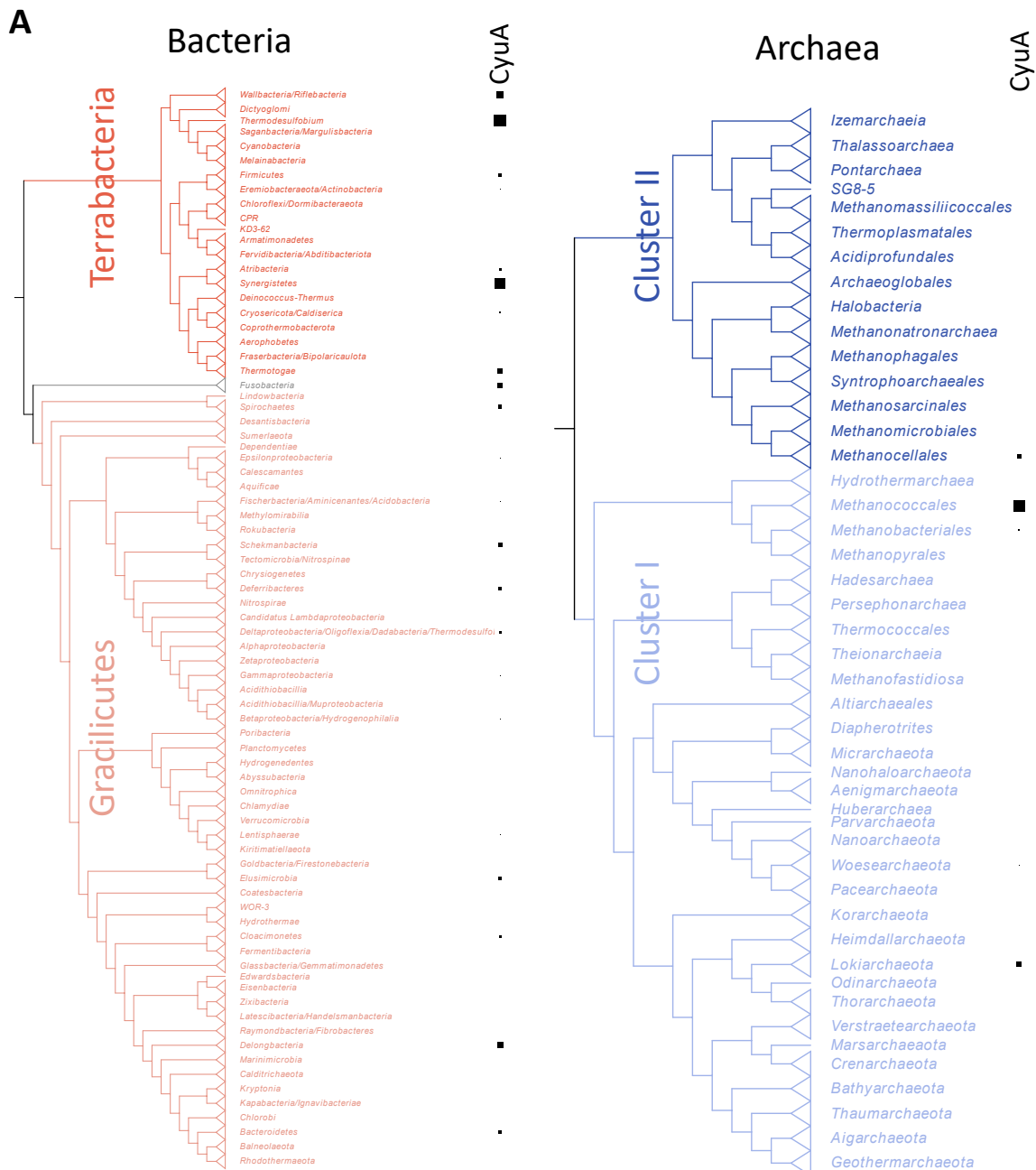
<b>Data collection</b> <sup>a</sup>	[4Fe-4S]-CyuA	[2Fe-2S]-CyuA + MES
Wavelength (Å)	0.980	0.978
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	67.1, 79.1, 156.3	64.0, 77.0, 153.5
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å) <sup>b</sup>	70.62 - 2.94 (4.00 - 2.94)	76.78 - 2.59 (2.75 - 2.59)
<i>R</i> <sub>meas</sub> (%) <sup>b</sup>		7 (346.9)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>		18.19 (0.59)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub> <sup>b</sup>		100 (33.4)
Completeness (%) <sup>b</sup>	82.5 (70.8)	99.5 (97.1)
Redundancy <sup>b</sup>		12.8
<i>B</i> Wilson (Å <sup>2</sup> )	109.8	104.1 (0.99)
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	70.62 - 2.942	76.78 - 2.65
No. reflections	15207	22273
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.230 / 0.287	0.226 / 0.288
No. atoms		5551
Protein	5242	5523
Fe, S	8	6, 6
ligand	10	12
Water	/	16
<i>B</i> factors (Å <sup>2</sup> )		
Protein	96.93	85.42
Fe, S	130.10	118.62
Ligands	80.50	79.10
Water	/	69.02
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.013	0.014
Bond angles (°)	1.88	1.88

<sup>a</sup> one crystal for each structure<sup>b</sup> Values in parentheses are for highest-resolution shell.

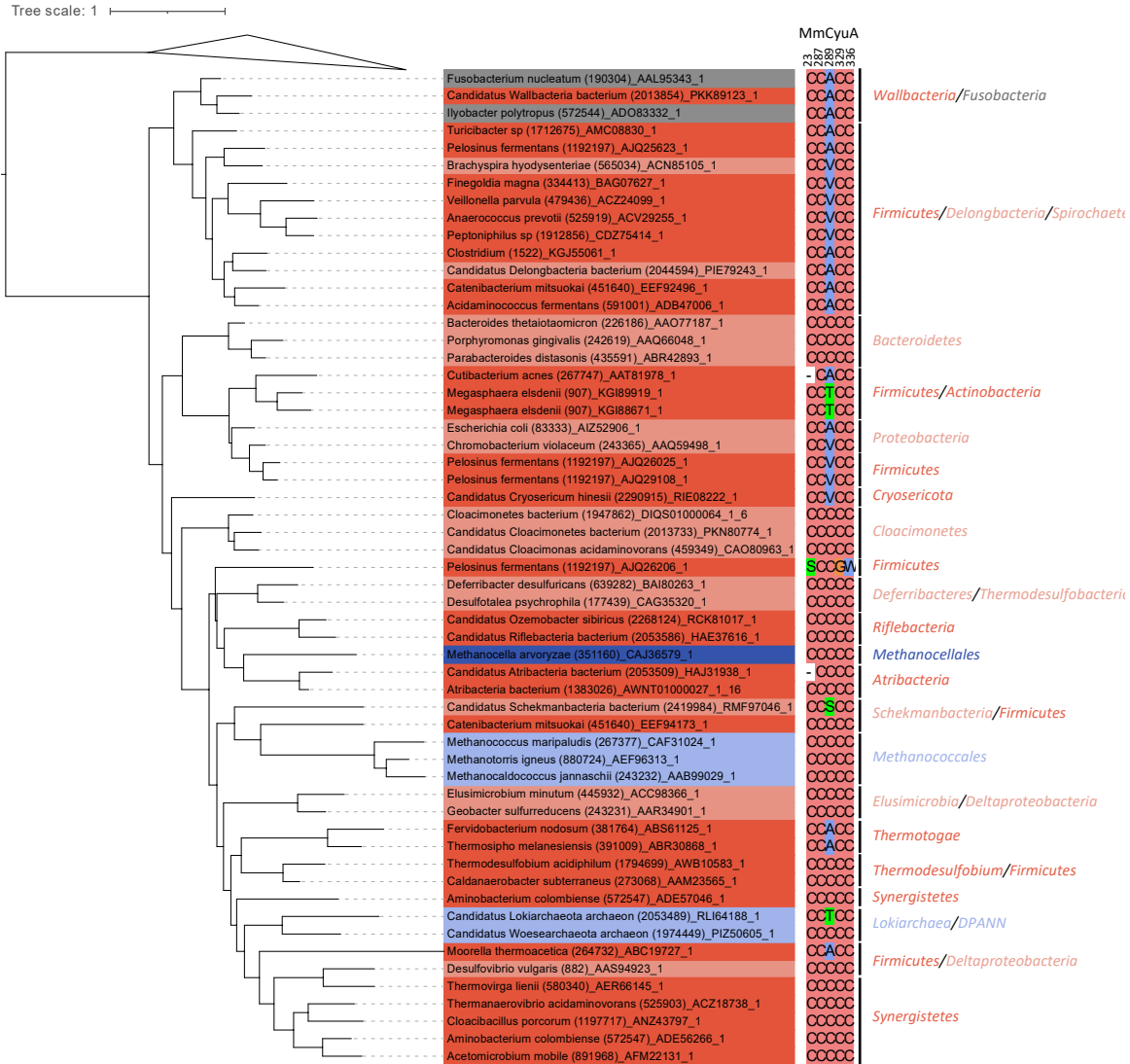


## Figures

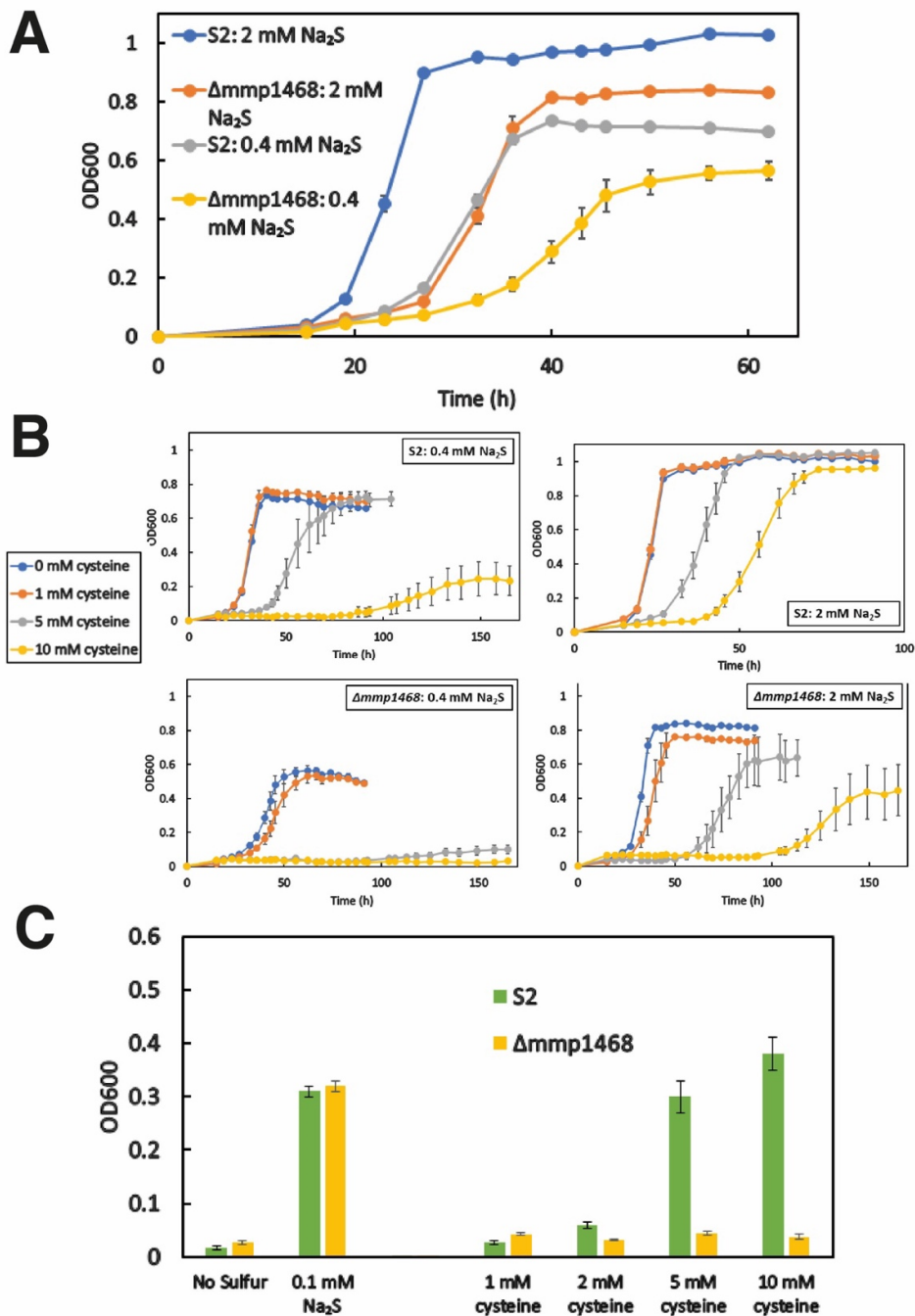
**Figure 1: CyuA emerged from Bacteria and is patchy distributed among Prokaryotes. A.** Taxonomic distribution of CyuA in Bacteria and Archaea. The phylogenetic trees of Archaea and Bacteria have been modified from (8), see Material & Methods. The dots at branches correspond to ultrafast-bootstraps > 95%. The percentage of genomes possessing at least one copy of CyuA per phylum/clade is indicated by a black square (maximum = 100% and 72% for Bacteria and Archaea, respectively). **B.** Phylogeny of CyuA (191 sequences, 236 aminoacid positions, IQ-TREE, LG+G4). The tree was rooted using L-serine dehydratase sequences as an outgroup (not shown). The dots at branches correspond to ultrafast-bootstraps > 95%. The scale bar represents the average number of substitutions per site. Color of tips correspond to the groups shown in A. The numbers in parenthesis correspond to the taxonomic IDs and the final numbers to the protein accession numbers. The major phyla/clades are indicated. The conservation of the 5 cysteines mentioned in the text is shown.



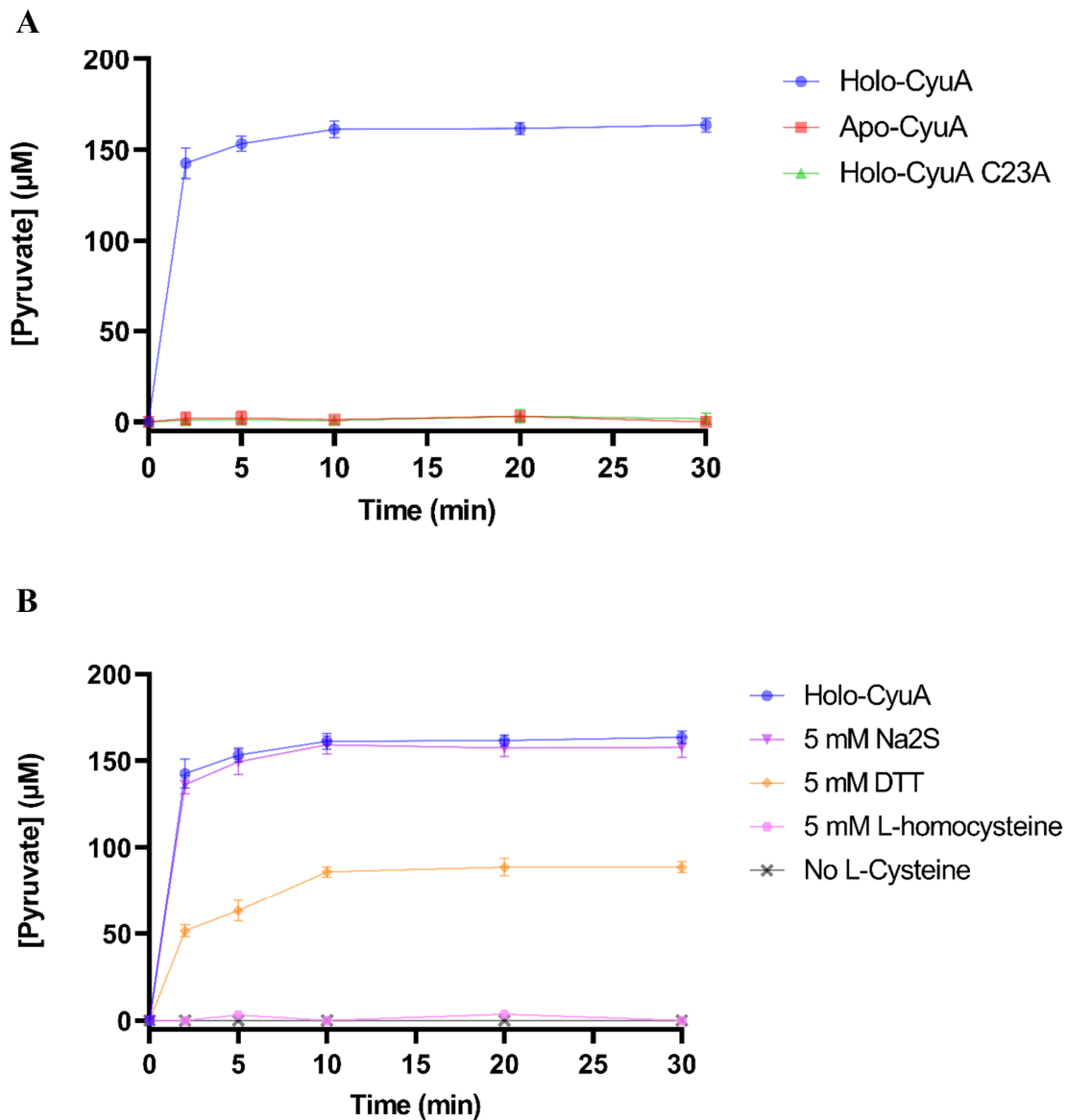
B



**Figure 2: Growth of the *M. maripaludis* S2 and  $\Delta mmp1468$  strains in the presence of  $\text{Na}_2\text{S}$  and/or cysteine.** **A** The *mmp1468* gene is important for growth of *M. maripaludis* in the presence of sodium sulfide. The S2 and  $\Delta mmp1468$  strains were grown to stationary phase in rich formate media in the presence of 2.0 mM or 0.4 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ . **B** Cysteine inhibits growth of the S2 and  $\Delta mmp1468$  strains grown in the presence of 2 mM or 0.4 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ . **C** The *mmp1468* gene enables *M. maripaludis* to use cysteine only as a sulfur source for growth. The final OD of the S2 and  $\Delta mmp1468$  strains grown under varied sulfide and cysteine conditions are shown. The inoculum per 5 mL culture was  $10^5$  cells in **A** and **B** and  $10^7$  cells in **C**. The means and standard error of the mean (SEM) of quintuplicate cultures are shown. Where error bars are not seen, the SEM was smaller than the node diameter.

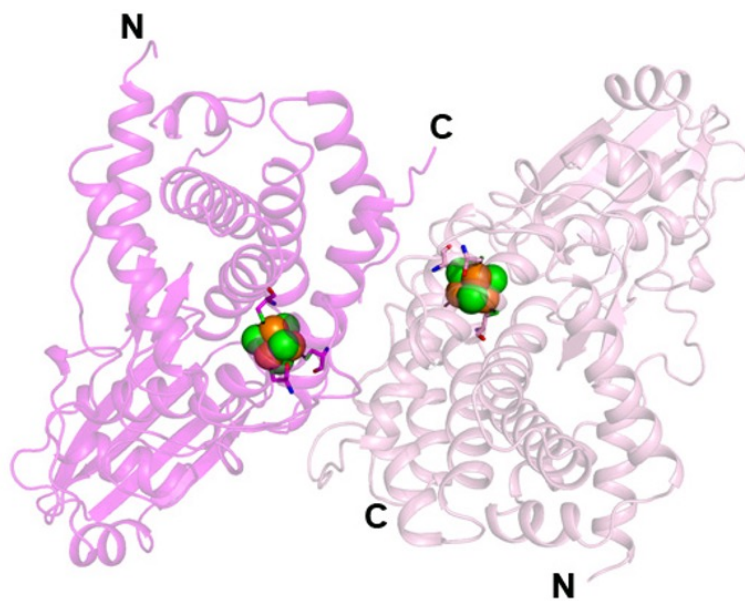


**Figure 3: Cysteine desulfidase activity of MmCyuA.** The various MmCyuA proteins (1  $\mu$ M) were incubated in the presence of 1 mM cysteine in 25 mM HEPES pH 7.5, 0.15 M NaCl. **A** In contrast to holo-MmCyuA, apo-MmCyuA and the C23A holo-MmCyuA mutant are inactive. **B** The activity of holo-CyuA is inhibited by 5 mM DTT but not by 5 mM Na<sub>2</sub>S and L-homocysteine is not a substrate.

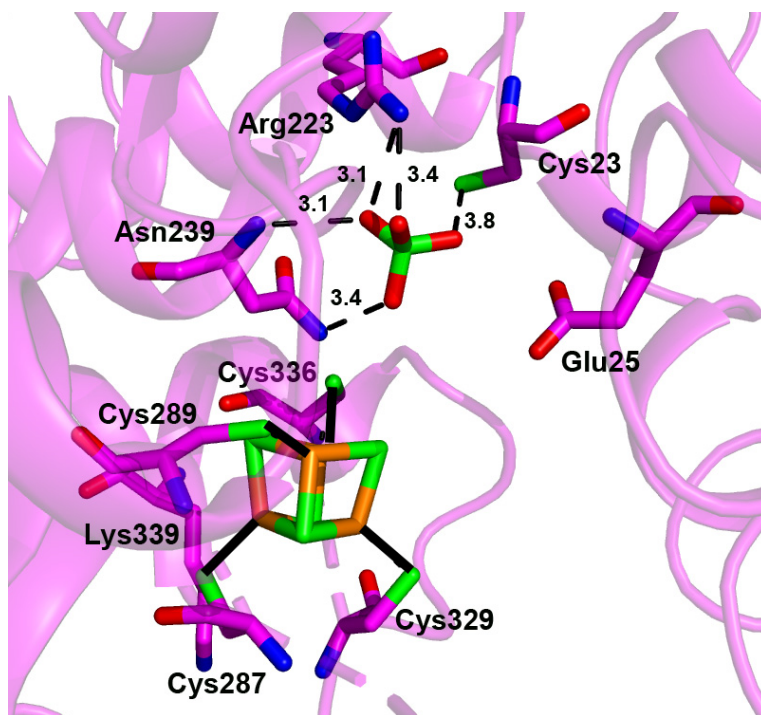


**Figure 4. Crystal structure of holo-MmCyuA.** **A** Overall structure of the holo-MmCyuA dimer (monomer A in magenta, monomer B in pink). The Fe and S atoms of the clusters are shown as orange and green spheres, respectively, and the cysteines that coordinate the cluster as sticks. N and C indicate the N and C termini, respectively. **B** Environment of the [4Fe-4S] cluster site in holo-MmCyuA alone (molecule A) with the bound sulfate molecule that locates an anionic site.

**A**



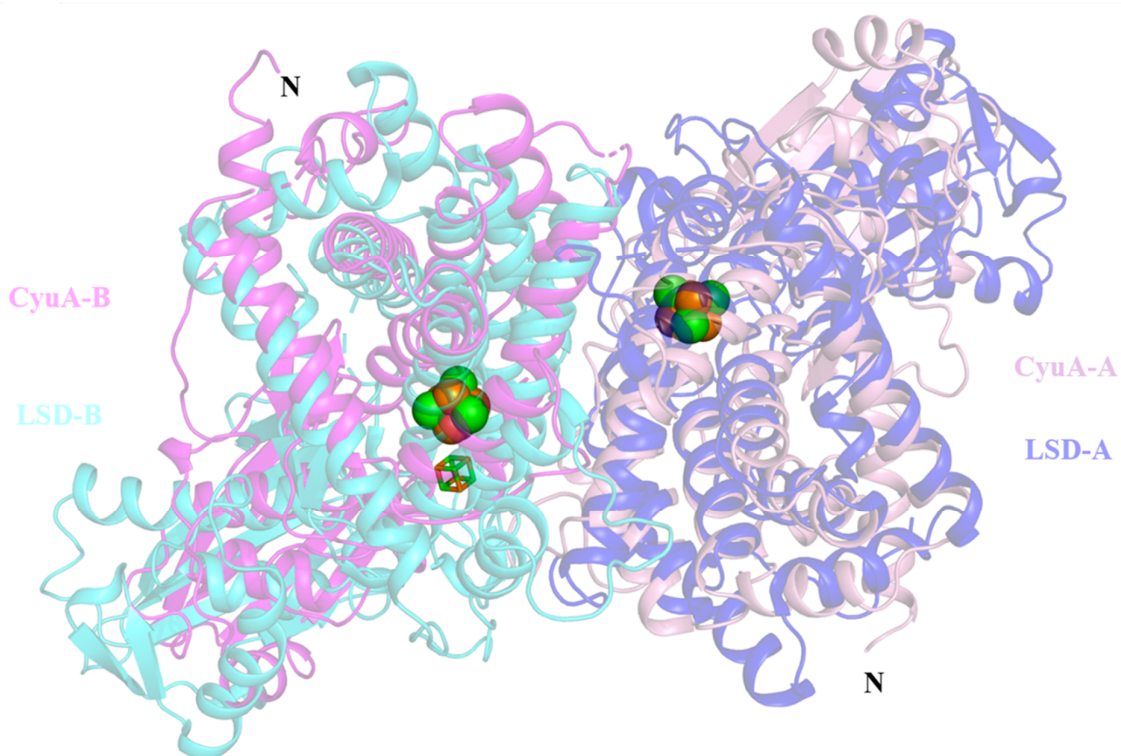
**B**



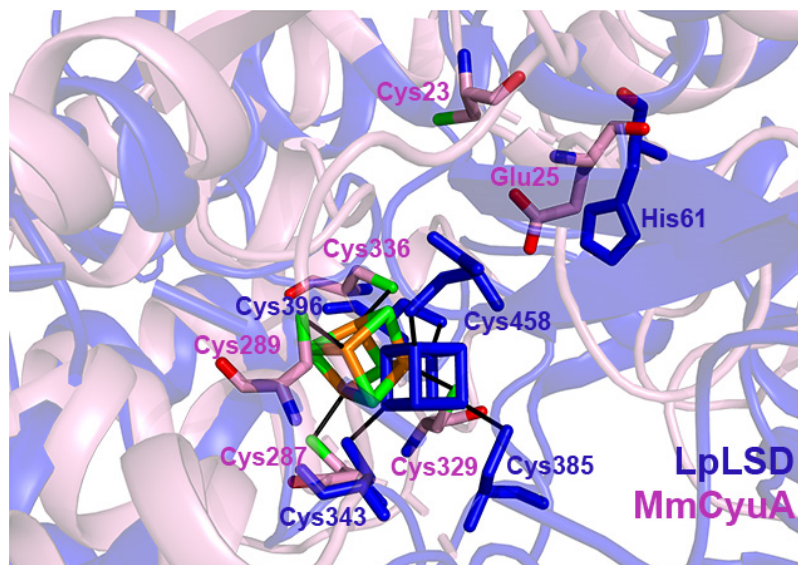


**Figure 5.** Comparison of the MmCyuA and LpLSD crystal structures. **A** Superposition of the dimers of MmCyuA (monomers in pink and magenta, clusters as spheres) and LpLSD (monomers in cyan and blue, clusters as sticks). The C-terminal catalytic domains of molecules A of MmCyuA and LpLSD were superposed using the SUPER option in PYMOL, with a rmsd of 4.3 Å for 128 aligned C $\alpha$ s. **B** Zoom of the MmCyuA (in pink) and LpLSD (in blue) catalytic sites (molecules A).

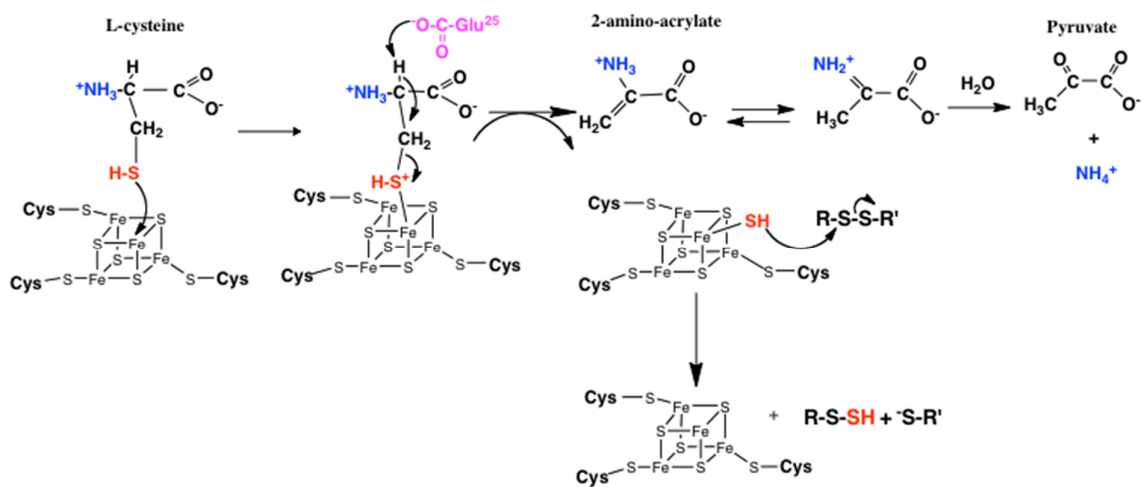
**A**



**B**



**Figure 6.** Proposed mechanism for [4Fe-4S]-dependent L-cysteine desulfidases.



## Supplementary Tables

**Table S1. Abundance of representative proteins and transcripts in *M. maripaludis***

proteins	Genetic loci	Proteome spectral counts <sup>a</sup>	Transcript abundance <sup>b</sup>	n <sup>c</sup>
methylreductase	MMP1555, 1558, 1559	46.0 ± 26.9	16300 ± 900	3
heterodisulfide reductase	MMP1053, 1054	12.1 ± 0.6	1530 ± 420	2
CO dehydrogenase	MMP0980-0985	2.6 ± 1.0	535 ± 183	6
tryptophan operon	MMP1002-1008	1.2 ± 0.6	91 ± 31	7
cysteine desulfidase	MMP1468	0.3	30	1

<sup>a</sup> From (20). Proteome of strain S2 grown on H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> in the presence of 2.8 mM cysteine and 3.2 mM sodium sulfide. Protein levels were estimated by the ratio of the number of peptides detected/ORF molecular weight.

<sup>b</sup> From (21). Transcripts abundance of strain S0001 grown on formate in the presence of 3.2 mM cysteine and 2.1 mM sodium sulfide are indicated as Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped (FPKM).

<sup>c</sup> The number of proteome spectral counts or transcripts compared



**Table S2:** The effect of sulfide and L-cysteine concentrations on growth rates, final cell yields, and lag times of *M. maripaludis* S2 and  $\Delta mmp1468$  strains.

**Low inoculum:  $10^5$  cells per 5 mL culture**

Strain	Na <sub>2</sub> S (mM)	L-cysteine (mM)	Growth rate (h <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> (doubling time in h)	Final OD <sub>600</sub>	Lag Time (h)
S2	2	0	0.32 +/- 0.004 (2.2)	1.04	19
$\Delta mmp1468$	2	0	0.23 +/- 0.01 (3)	0.84	26
S2	2	1	0.33 +/- 0.02 (2.1)	1.05	18
$\Delta mmp1468$	2	1	0.21 +/- 0.01 (3.3)	0.77	33
S2	2	5	0.16 +/- 0.09 (2.2)	1.08	28
$\Delta mmp1468$	2	5	0.13 +/- 0.09 (5.3)	0.76	73
S2	2	10	0.16 +/- 0.01 (4.3)	0.98	42
$\Delta mmp1468$	2	10	0.066 +/- 0.009 (11)	0.52	130
S2	0.4	0	0.19 +/- 0.002 (3.6)	0.73	25
$\Delta mmp1468$	0.4	0	0.13 +/- 0.009 (5.3)	0.58	32
S2	0.4	1	0.22 +/- 0.01 (3.2)	0.77	25
$\Delta mmp1468$	0.4	1	0.14 +/- 0.004 (5.0)	0.56	35
S2	0.4	5	0.16 +/- 0.03 (4.3)	0.77	47
$\Delta mmp1468$	0.4	5	0.04 +/- 0.009 (17)	0.17	130
S2	0.4	10	0.07 +/- 0.03 (9.9)	0.29	140
$\Delta mmp1468$	0.4	10	N.G.	N.G.	N.G.

**High inoculum:  $10^7$  cells per 5 mL culture**

Strain	Na <sub>2</sub> S (mM)	L-cysteine (mM)	Growth rate (h <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> (doubling time in h)	Final OD <sub>600</sub>	Lag Time (h)
S2	0.1	0	N.D.	0.31	<16
$\Delta mmp1468$	0.1	0	0.057 +/- 0.005 (12)	0.32	16
S2	0	5	0.036 +/- 0.01 (19)	0.30	440
$\Delta mmp1468$	0	5	N.G.	N.G.	N.G.
S2	0	10	0.027 +/- 0.002 (26)	0.38	230
$\Delta mmp1468$	0	10	N.G.	N.G.	N.G.

N.G. = No observed growth within 500 h.

N.D. = Not determined.

<sup>1</sup>The mean and standard error of the mean (SEM) were calculated from the highest growth rate for each tube within a growth condition.

**Table S3. Primers used for deletion of the *mmp1468* gene.**

**A. Primers for UP PCR.**

Primers	TM (°C) <sup>§</sup>	Sequences (5'-3')	Product(bp)
Up_FP	52	TGCACCAGCACCAAGAG	735
Up_RP	55	GGGAAAGGCCTGACTGGCCATCCATAATATCAACTAAATCTTTAG	

**B. Primers for DOWN PCR.**

Primers	TM (°C) <sup>§</sup>	Sequences (5'-3')	Product(bp)
Down_FP	53	GGGAAAGGCCAAGGTGGCCAATTTAATATTTTTTCTATTTTATTCTTCG	594
Down_RP	53	ATTACCGGTGAAGAATACG	

**C. Standardized primers for p5L vectors.**

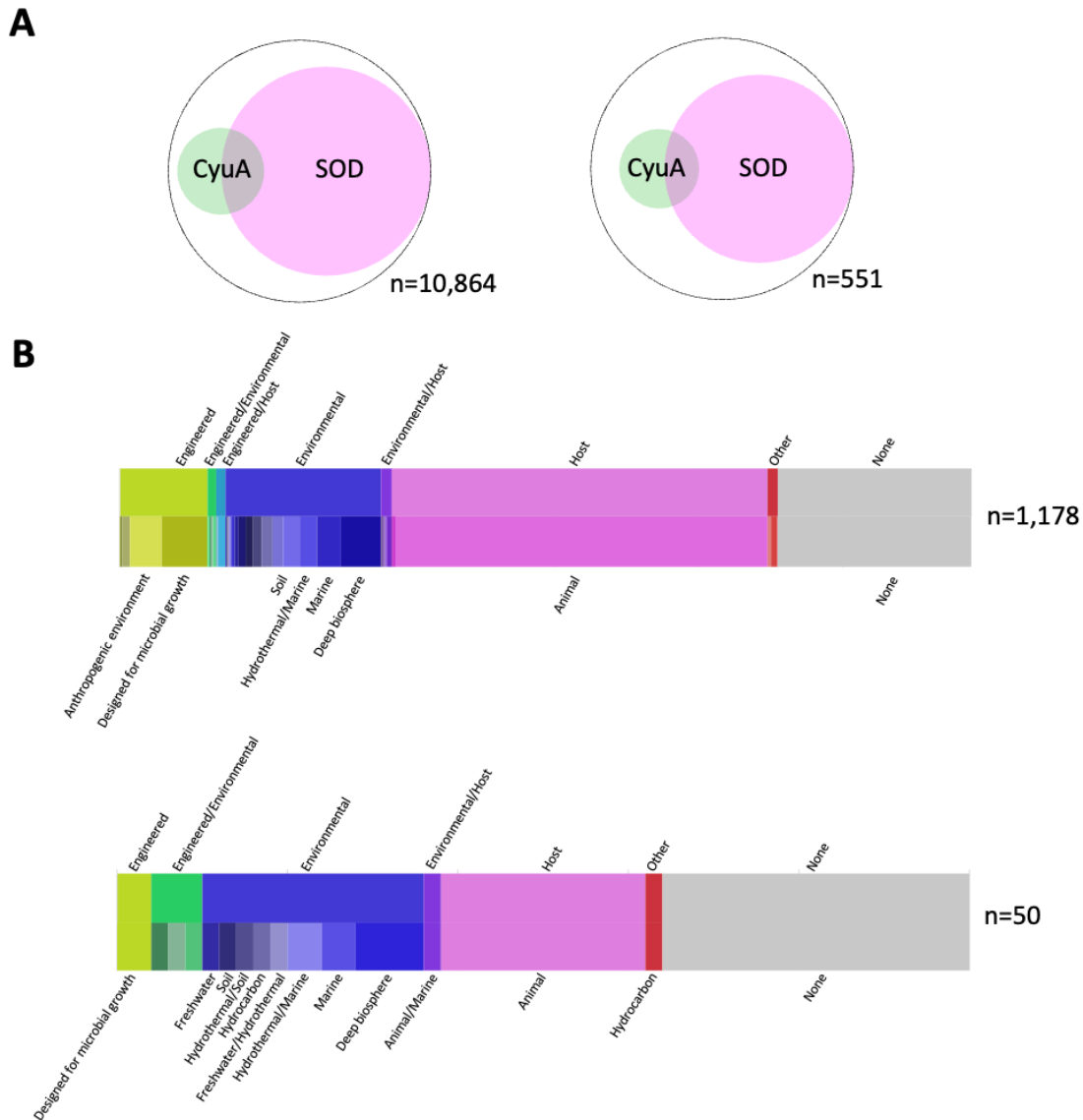
Primers	TM (°C) <sup>§</sup>	Sequences (5'-3') <sup>¶</sup>	Product(kb)
RE-F(SfiI-a)	65	GGGAAAGGCC <b>AGTCAGGCC</b> GAAAGGGGGATGTGCTGC	1.67
RE-R(SfiI-b)	66	GGGAAAGGCC <b>ACCTTGGCCT</b> GGAAGCTTGATTTAAATTTAGTGGAAATTC	

<sup>§</sup>TM values are calculated by the NEB Tm Calculator <https://tmcalculator.neb.com/> with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase as the polymerase kit.

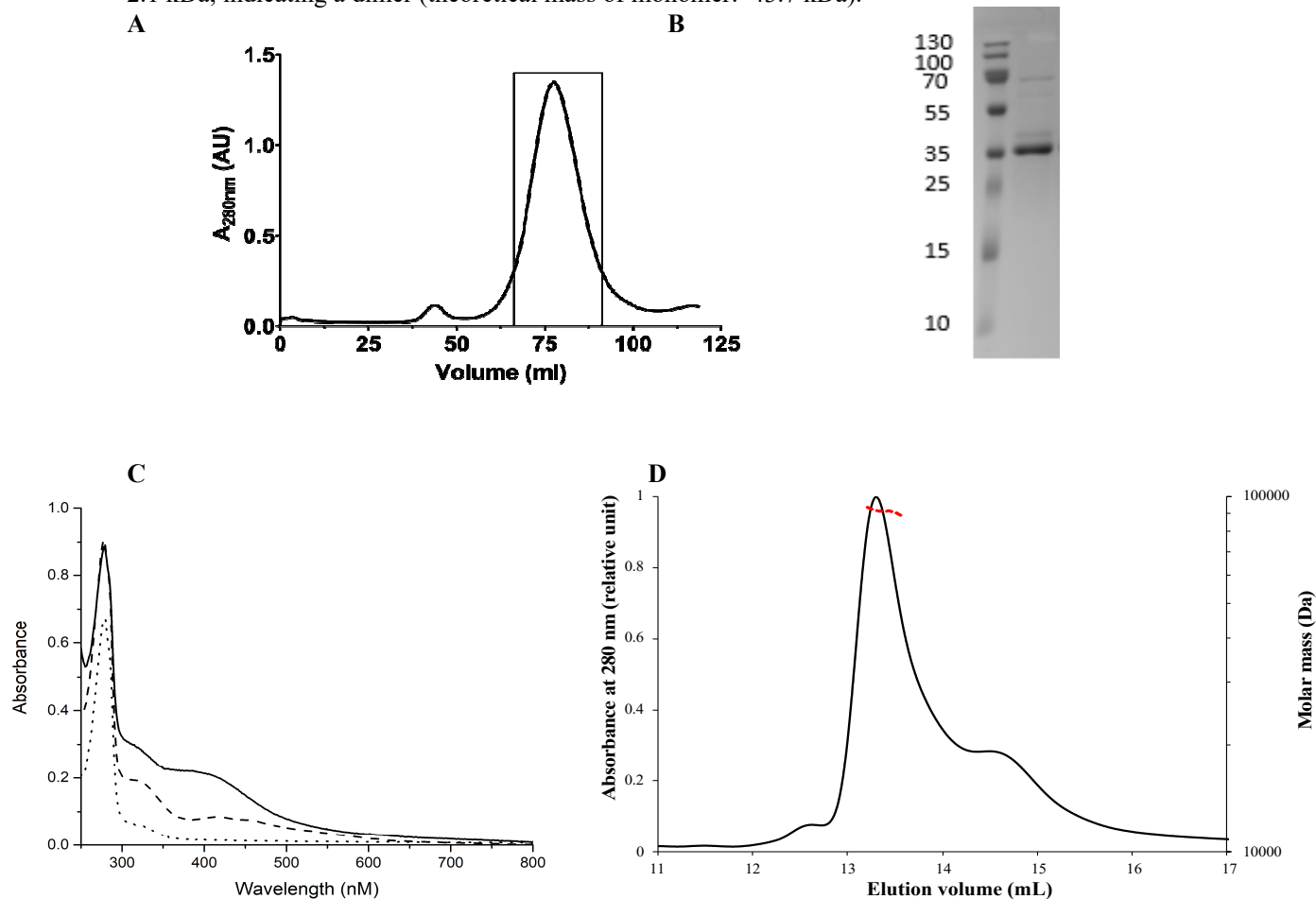
<sup>¶</sup>The SfiI sites are indicated in bold.

## Supplementary Figures

**Figure S1. Analysis of the environments of organisms possessing CyuA.** **A.** Venn diagram of genomes possessing CyuA, the Super Oxide Dismutase (SOD), or both. Left: analysis of the entire database of 10,864 proteomes of prokaryotes. Right: analysis of the subsampled database of 551 representative proteomes of prokaryotes, with the number of proteomes per phylum/major clade being of the same order. The number of proteomes used is indicated. **B.** The different ecological niches of organisms possessing CyuA. Top: analysis of the entire database of 10,864 proteomes of prokaryotes. Bottom: analysis of the subsampled database of 551 representative proteomes of prokaryotes. The number of proteomes possessing CyuA that have been analyzed is indicated.

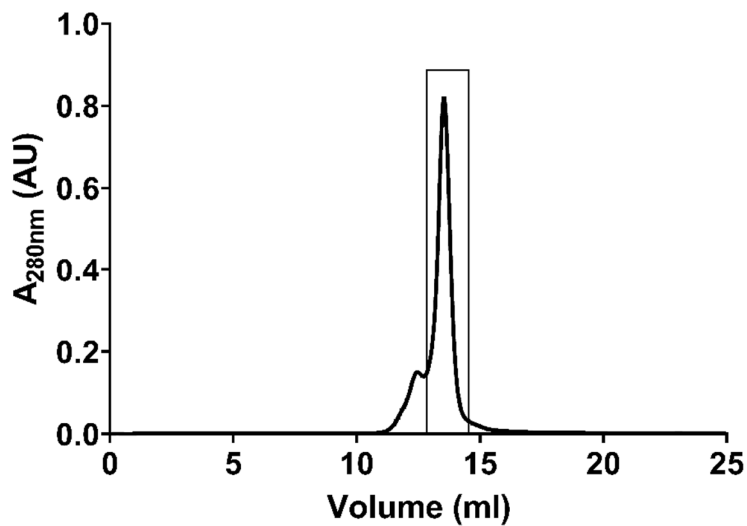


**Figure S2. Purification and characterization of as-purified MmCyuA.** **A** Purification of MmCyuA under aerobic conditions on a Sephacryl S200 gel filtration column in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. The framed fractions are pooled. **B** 14% SDS-PAGE gel of as-purified MmCyuA. **C** UV-visible spectra of as-purified MmCyuA (dashed line), apo-MmCyuA (dotted line) and holo-MmCyuA (thick line). The spectra were recorded with 40  $\mu$ M protein in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl. **D** SEC-MALS analysis of apo-MmCyuA. Apo-MmCyuA (2mg/ml) was loaded onto a Superdex 200 10/300 GL increase column equilibrated with 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl. The absorbance at 280 nm (black line) and weighted-average molar mass (dotted red line) are plotted as a function of the elution volume. The first main peak corresponds to a molar mass of  $78.6 \pm 2.1$  kDa, indicating a dimer (theoretical mass of monomer: 43.7 kDa).

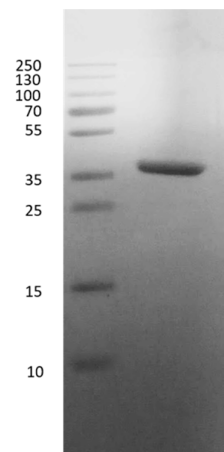


**Figure S3. Purification and characterization of holo-MmCyuA.** **A** Chromatographic profile of holo-MmCyuA on a Sephacryl S200 gel filtration column. **B** 14% SDS-PAGE gel of holo-MmCyuA. **C** SEC-MALS analysis of holo-MmCyuA. Holo-MmCyuA (2mg/ml) was loaded onto a Superdex 200 10/300 GL increase column equilibrated with 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl. The absorbance at 280 nm (black line) and weighted-average molar mass (dotted red line) are plotted as a function of the elution volume. The first main peak corresponds to a molar mass of  $80.8 \pm 2.1$  kDa, indicating a dimer (theoretical mass of monomer: 43.7 kDa).

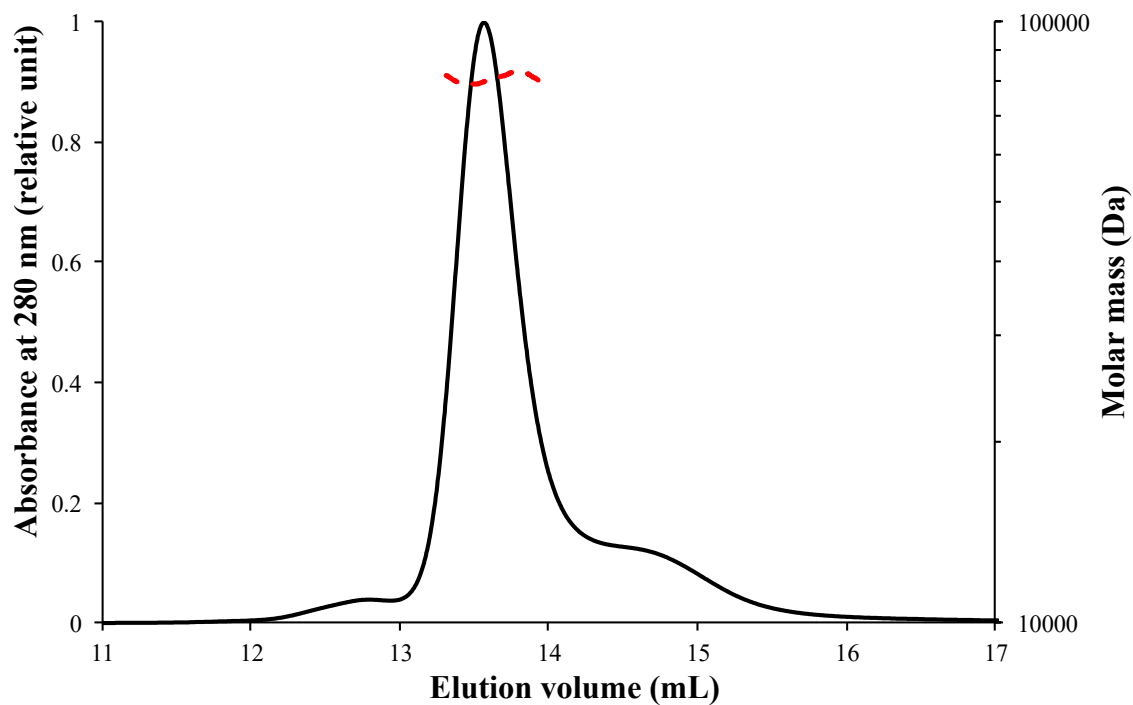
**A**



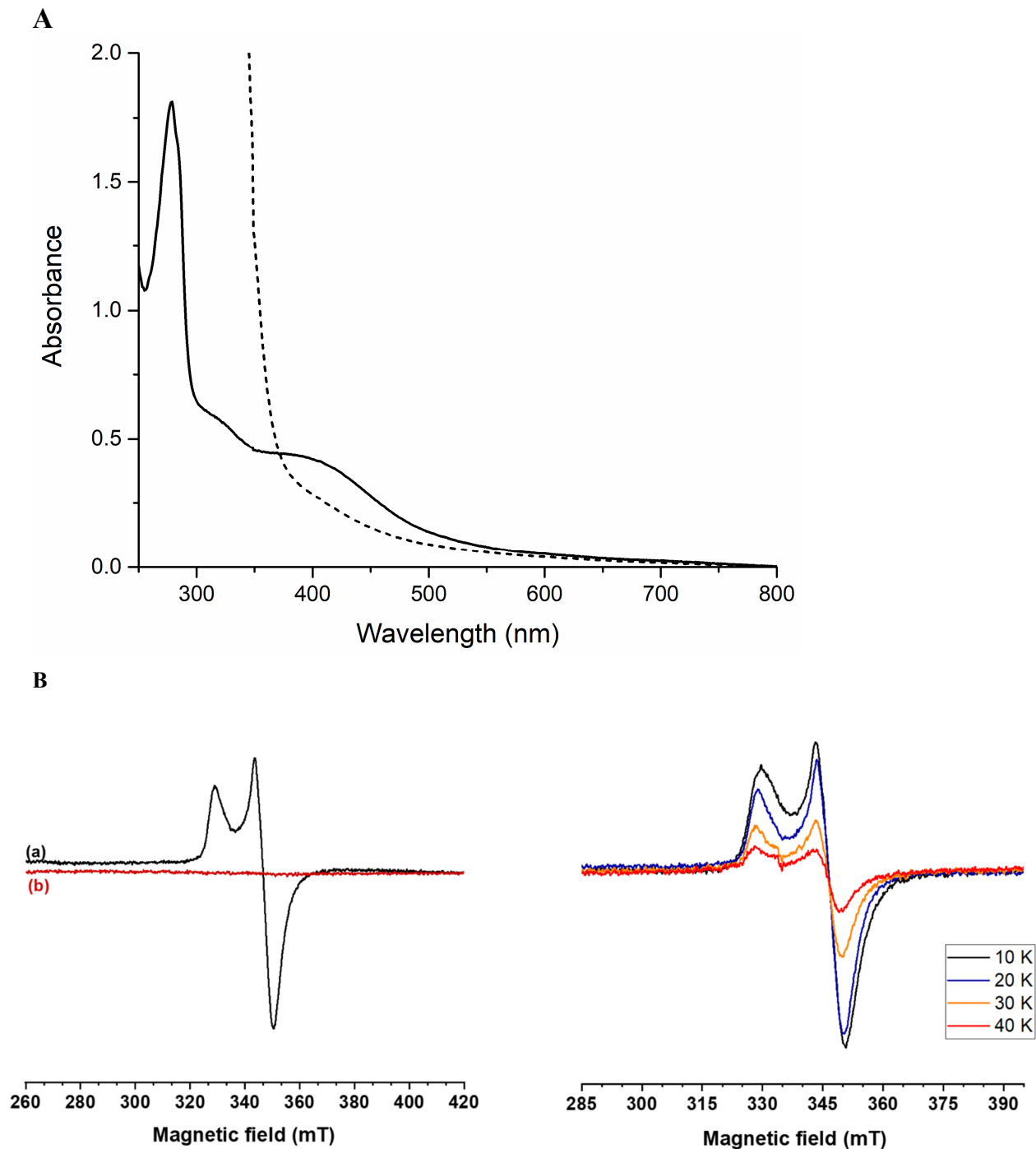
**B**



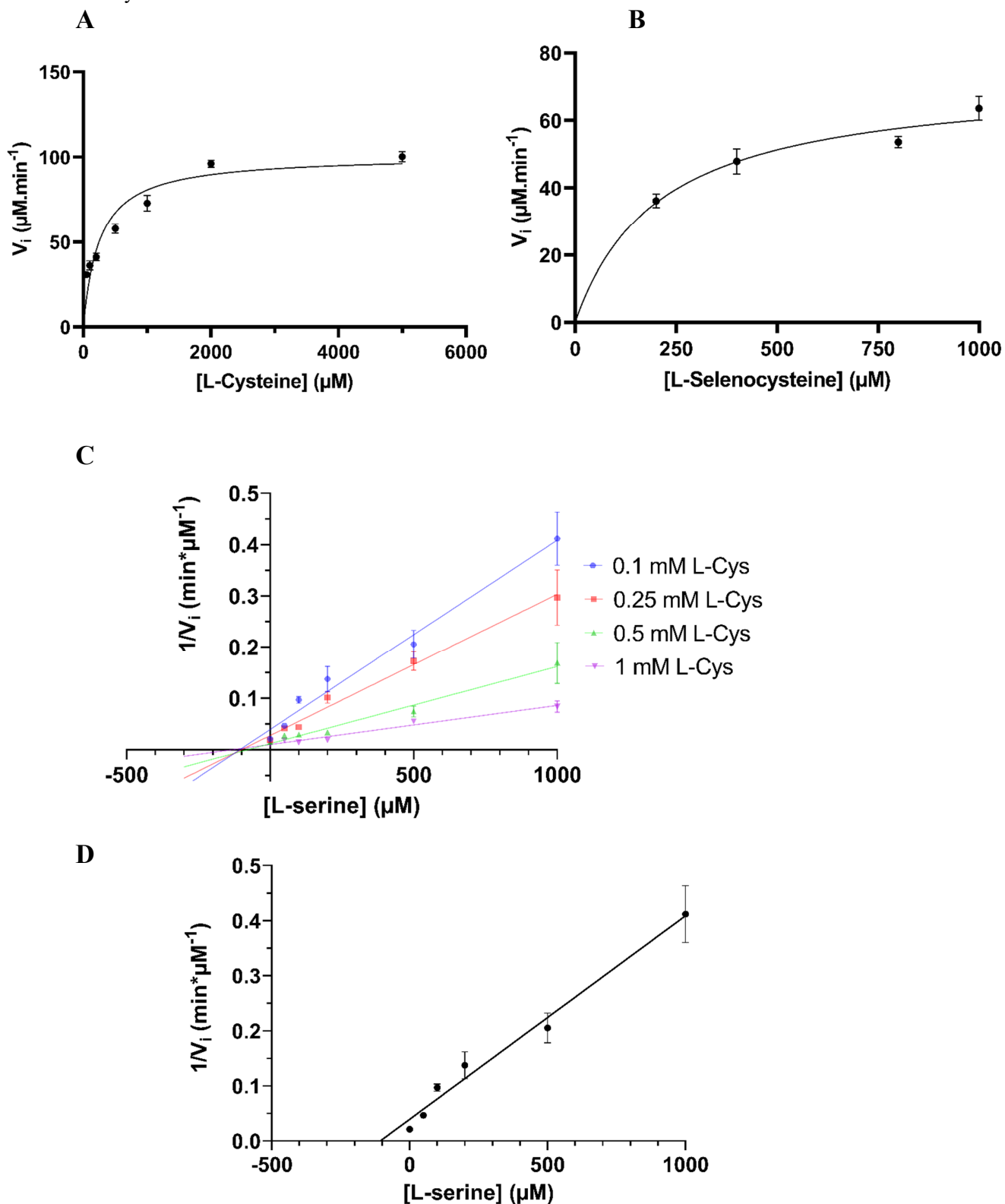
**C**



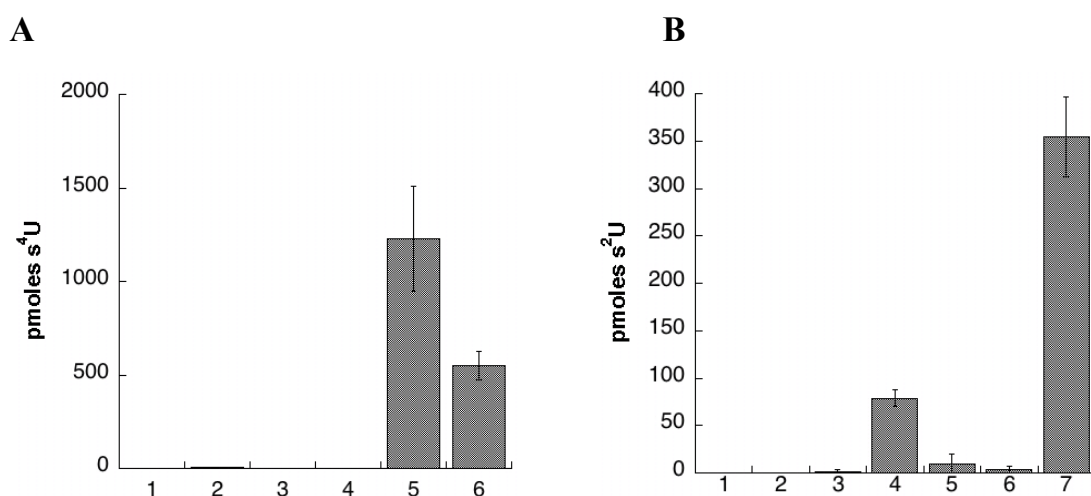
**Figure S4. Spectroscopic characterization of holo-MmCyuA.** **A** UV-visible spectra of holo-MmCyuA (thick line) and reduced holo-MmCyuA (dashed line) after incubation with 1 mM dithionite for 20 min. The spectra were recorded with 40  $\mu$ M protein in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl. **B** X-band EPR spectrum of MmCyuA. CW-EPR spectrum of holo-MmCyuA (200  $\mu$ M) in 25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, before (in red) and after (in black) reduction with 5 mM dithionite for 30 min at 20°C. **C** Variation with temperature of the X-band CW-EPR spectrum of reduced MmCyuA at 2 mW.



**Figure S5. Determination of the kinetic parameters for cysteine and selenocysteine as substrates, and serine as an inhibitor of MmCyuA.** Incubations were performed with 1  $\mu\text{M}$  MmCyuA in 25 mM HEPES pH 7.5, 0.15 M NaCl. Data were fitted to the Michaelis-Menten equation by nonlinear regression using GraphPad. **A and B** Determination of the Michaelis constants of holo-MmCyuA for L-cysteine (A) or L-selenocysteine (B) as substrates. **C and D** L-serine is a competitive inhibitor of MmCyuA.



**Figure S6. holo-MmCyuA can provide sulfur from L-cysteine to tRNA thiolases *in vitro*.** Conditions for  $s^4U$ - and  $s^2U$ -tRNA formation by MmTtuI and MmNcsA monitored by HPLC-coupled MS/MS after tRNA digestion. The data shown are mean values based on 3 different experiments. **A** apo- or holo-MmCyuA (10  $\mu$ M) was incubated with apo- or holo-MmTtuI (1  $\mu$ M) and tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> transcript (15  $\mu$ M), in the absence or presence of cysteine (1 mM) or Na<sub>2</sub>S (1 mM) as the sulfur source. (1) tRNA alone. (2) apo-MmTtuI, holo-MmCyuA and cysteine. (3) holo-MmTtuI, apo-MmCyuA and cysteine. (4) holo-MmTtuI, holo-MmCyuA in the absence of cysteine. (5) holo-MmTtuI, holo-MmCyuA and cysteine. (7) holo-MmTtuI and Na<sub>2</sub>S. **B** apo- or holo-MmCyuA (2  $\mu$ M) was incubated with apo or holo-MmTtuI (1  $\mu$ M) and tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> transcript (20  $\mu$ M) in the presence or absence of cysteine (0.25 mM) or Na<sub>2</sub>S (0.25 mM) as the sulfur source. (1) tRNA alone. (2) apo-MmNcsA and Na<sub>2</sub>S. (3) holo-MmNcsA and no sulfur source. (4) holo-MmNcsA and Na<sub>2</sub>S. (5) holo-MmNcsA apoMmCyuA and cysteine. (6) apo-MmNcsA, holo-MmCyuA and cysteine. (7) holo-MmNcsA, holo-MmCyuA and cysteine.





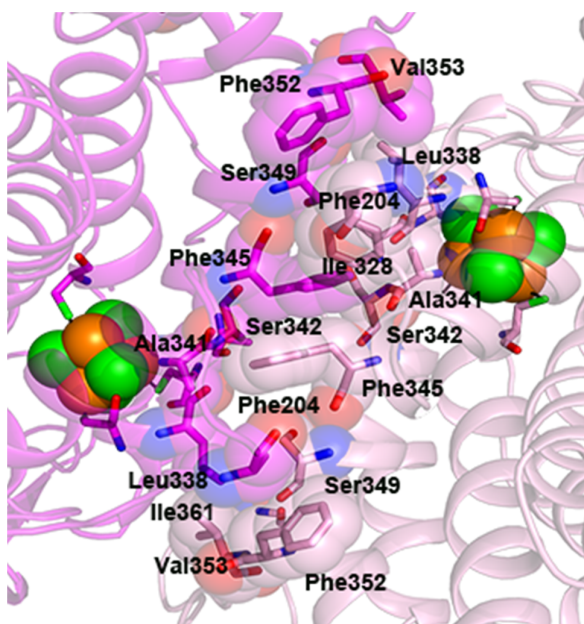




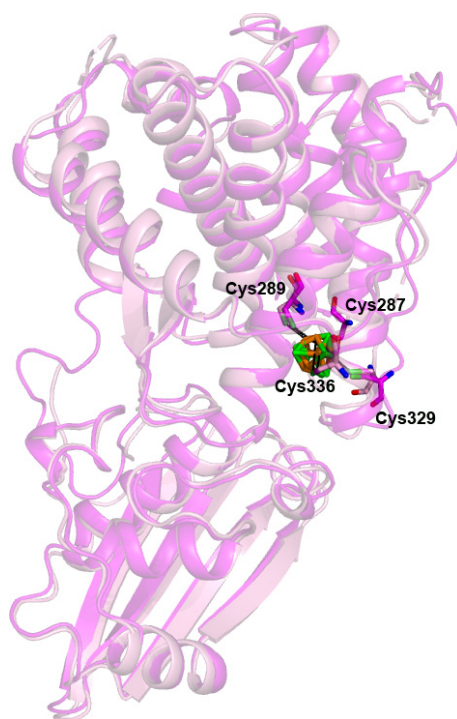


**Figure S8. Overall fold of MmCyuA and interface between two monomers in the holo-MmCyuA crystal structure.** **A** Hydrophobic interactions at the dimer interface of the holo-MmCyuA crystal structure (same orientation as Figure 3A; monomer A in magenta, monomer B in pink). **B** Topology diagram calculated with TOPDRAW in CCP4 showing the arrangement of the  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets in MmCyuA. **C** Superposition of the two molecules of the MmCyuA structure. Molecules A and B of the MmCyuA structure were superimposed in PYMOL with an rmsd of 0.74 Å for 301 aligned C $\alpha$ s.

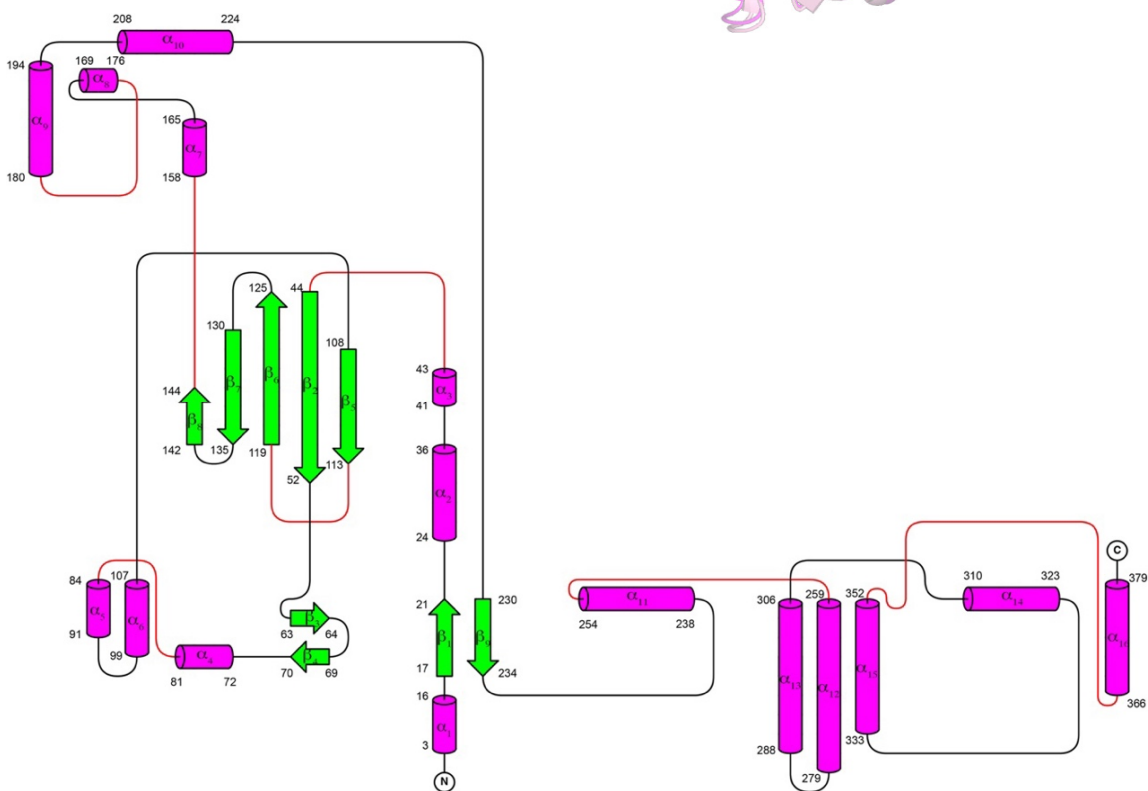
**A**



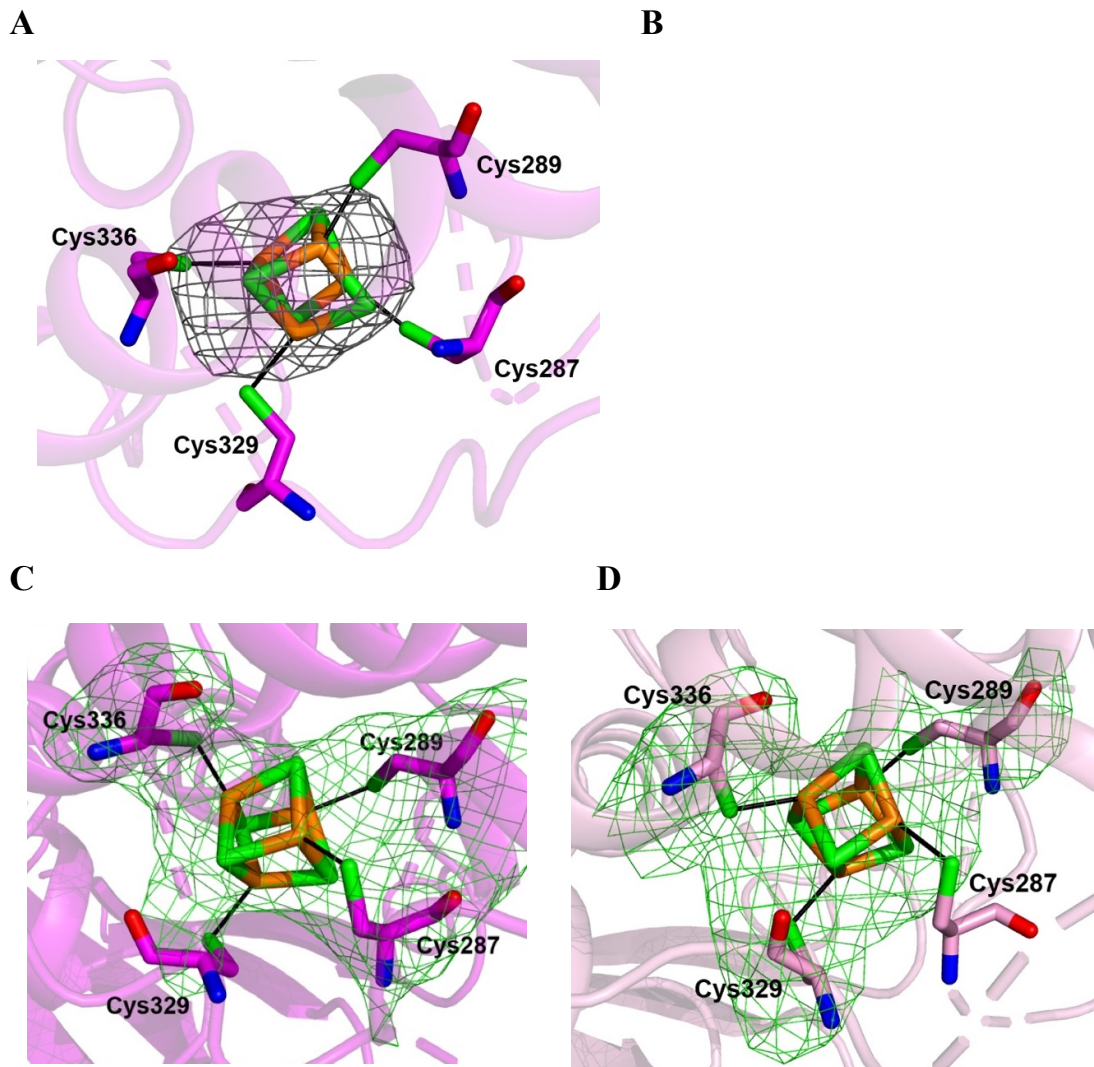
**C**



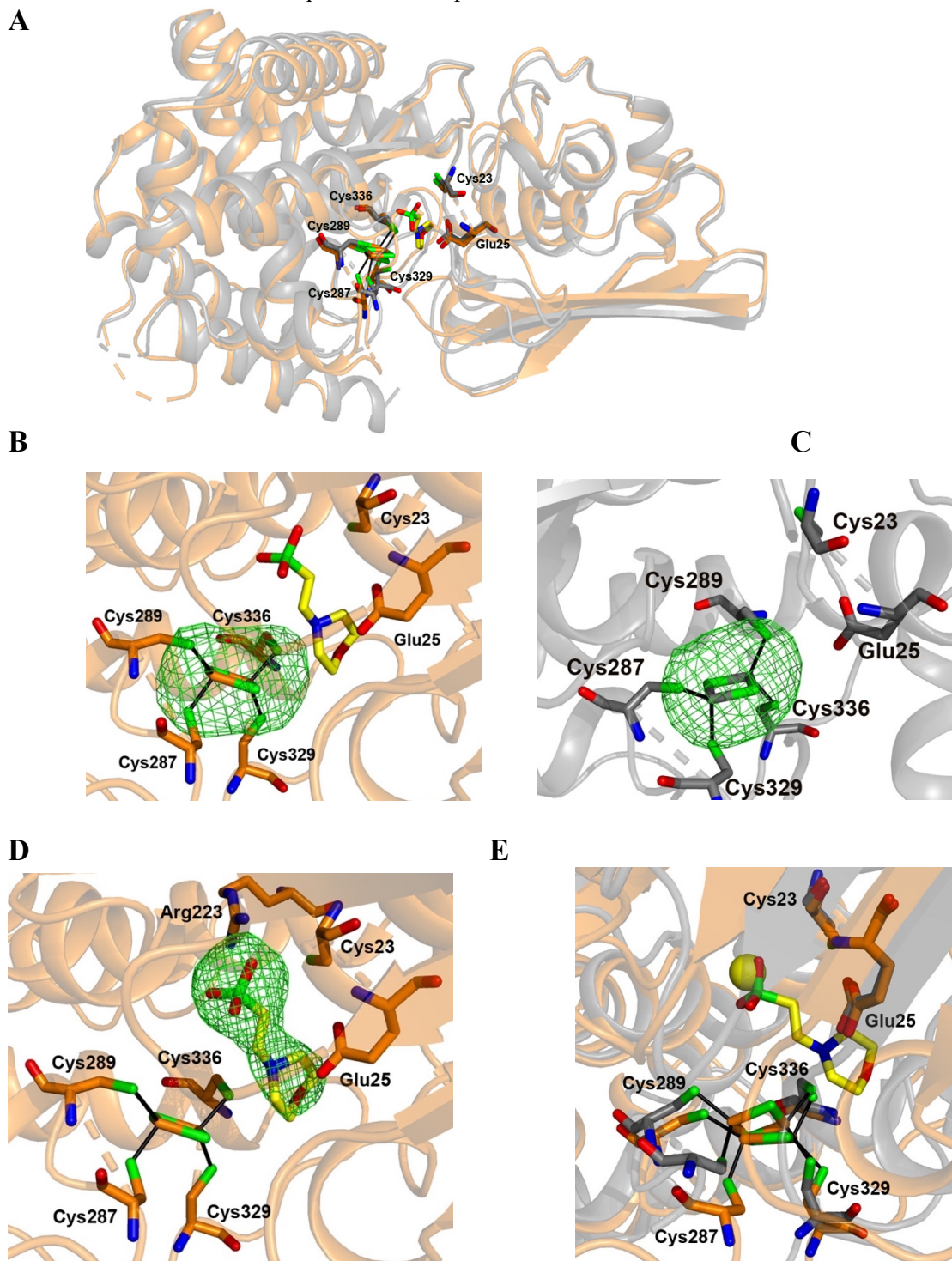
**B**



**Figure S9.** Electron density maps for the nonliganded MmCyuA structure. **A & B** Anomalous maps contoured at  $3.5 \sigma$  (in grey) for data collected at the K-edge of iron for the nonliganded holo-MmCyuA crystal structure. **A** Molecule A. **B** Molecule B. **C & D** Fo-Fc maps contoured at 2.5 sigmas (in green) omitting the cluster and the four chelating cysteines in molecule A (**C**) and B (**D**).



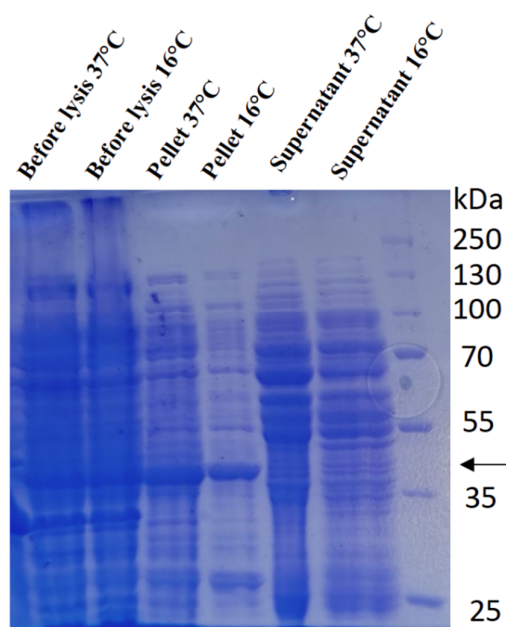
**Figure S10. Structure of [2Fe-2S]-MmCyuA in complex with MES.** **A** Superposition of molecules A (in orange) and B (in grey) of [2Fe-2S]-MmCyuA in complex with MES. Molecules A and B were superimposed in PYMOL with an rmsd of 1.12 Å for 337 aligned C $\alpha$ s. The MES ligand in molecule A is shown as yellow sticks. **B** Fo-Fc anomalous map contoured at 3.5 sigmas centered on the active site of molecule A with MES in yellow sticks. **C** Fo-Fc anomalous map contoured at 3.5 sigmas centered on the active site of molecule B. **D** Fo-Fc map (in green) omitting the MES ligand contoured at 3 sigmas. **E** Fo-Fc omit map contoured at 3.5 sigmas omitting the active site chloride ion in molecule. **F** Superposition of the activrs sites of molecules A and B of the [2Fe-2S]-MmCyuA structure. The chloride ion in molecule B is represented as a sphere.



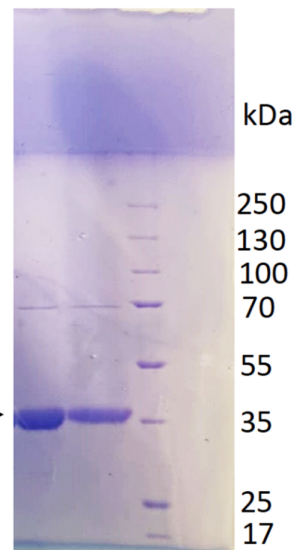


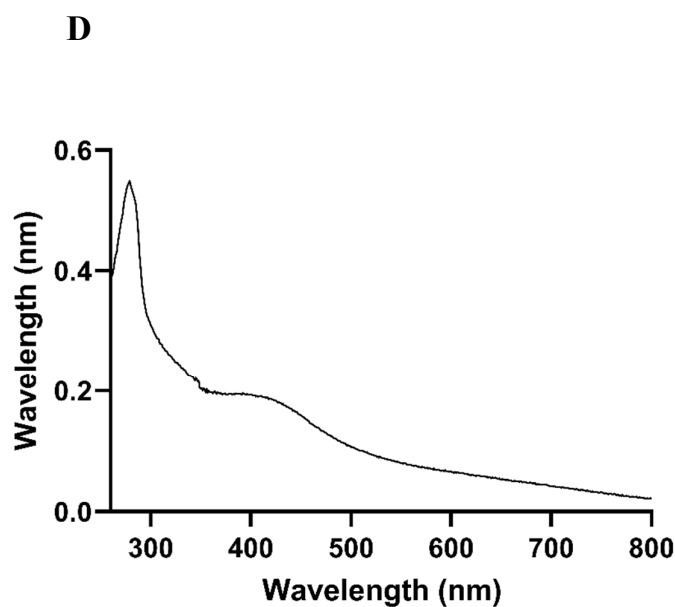
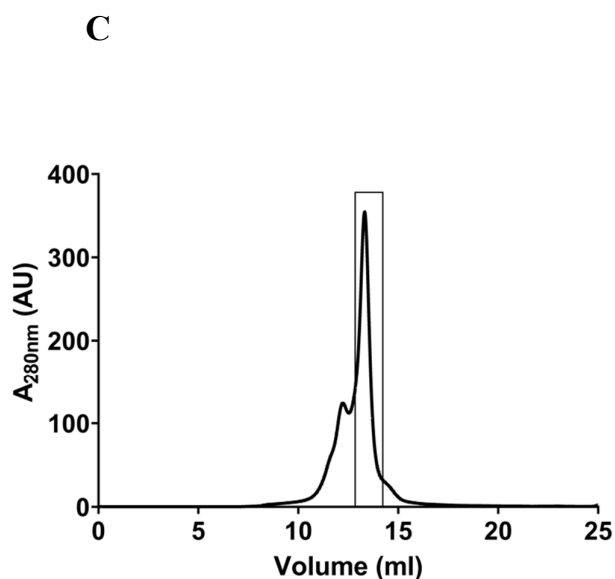
**Figure S11. Expression and purification of the C23A and E25N mutants.** **A** 14% SDS-PAGE gel analysis of expression assays of the E25N-MmCyuA mutant. **B** SDS-PAGE gel after purification of the C23A-MmCyuA mutant. **C** Chromatographic profile of holo-C23A-MmCyuA mutant on an Increase S200 gel filtration column. The framed fractions are pooled. **D** UV-visible spectrum of holo-C23A-MmCyuA mutant (25  $\mu$ M).

**A**



**B**





1. H. Beinert, A tribute to sulfur. *Eur J Biochem* **267**, 5657-5664 (2000).
2. N. M. Kredich, Biosynthesis of Cysteine. *EcoSal Plus* **3** (2008).
3. Y. Kawano, K. Suzuki, I. Ohtsu, Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 8203-8211 (2018).
4. D. Kessler, Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 825-840 (2006).
5. S. Leimkühler, M. Buhning, L. Beilschmidt, Shared Sulfur Mobilization Routes for tRNA Thiolation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Prokaryotes and Eukaryotes. *Biomolecules* **7** (2017).
6. K. A. Black, P. C. Dos Santos, Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1470-1480 (2015).
7. Y. Takahashi, U. Tokumoto, A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**, 28380-28383 (2002).
8. P. S. Garcia *et al.*, An early origin of iron-sulfur cluster biosynthesis machineries before Earth oxygenation. *Nat Ecol Evol.* **6**, 1564-1572 (2022).
9. R. Lill, U. Muhlenhoff, Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 457-486 (2006).
10. A. D. Tsaousis, On the origin of iron/sulfur cluster biosynthesis in eukaryotes. *Front Microbiol* **10**, 2478 (2019).
11. M. Cavuzic, Y. Liu, Biosynthesis of Sulfur-Containing tRNA Modifications: A Comparison of Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Pathways. *Biomolecules* **7** (2017).

12. H. Mihara, N. Esaki, Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 12-23 (2002).
13. T. Fujishiro, R. Nakamura, K. Kunichika, Y. Takahashi, Structural diversity of cysteine desulfurases involved in iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biophys Physicobiol* **19**, 1-18 (2022).
14. Y. Liu, L. L. Beer, W. B. Whitman, Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environ Microbiol* **14**, 2632-2644 (2012).
15. A. Sauerwald *et al.*, RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* **307**, 1969-1972 (2005).
16. T. Mukai *et al.*, RNA-Dependent Cysteine Biosynthesis in Bacteria and Archaea. *mBio* **8**, e00561-00517 (2017).
17. Y. Liu, M. Sieprawska-Lupa, W. B. Whitman, R. H. White, Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Biol Chem* **285**, 31923-31929 (2010).
18. M. Kotera *et al.*, Comprehensive genomic analysis of sulfur-relay pathway genes. *Genome Inform* **24**, 104-115 (2010).
19. S. I. Tchong, H. Xu, R. H. White, L-cysteine desulfidase: an [4Fe-4S] enzyme isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* that catalyzes the breakdown of L-cysteine into pyruvate, ammonia, and sulfide. *Biochemistry* **44**, 1659-1670 (2005).
20. Q. Xia *et al.*, Quantitative proteomics of the archaeon *Methanococcus maripaludis* validated by microarray analysis and real time PCR. *Mol Cell Proteomics* **5**, 868-881 (2006).
21. W. Zhang *et al.*, Internal transcription termination widely regulates differential expression of operon-organized genes including ribosomal protein and RNA polymerase genes in an archaeon. *Nucleic Acids Res* (2023).
22. T. Shimada, K. Tanaka, A. Ishihama, Transcription factor DecR (YbaO) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli*. *Microbiology* **162**, 1698-1707 (2016).
23. G. Nonaka, K. Takumi, Cysteine degradation gene yhaM, encoding cysteine desulfidase, serves as a genetic engineering target to improve cysteine production in *Escherichia coli*. *AMB Express* **7**, 90 (2017).
24. Y. Zhou, J. A. Imlay, *Escherichia coli* Uses a Dedicated Importer and Desulfidase To Ferment Cysteine. *mBio* **13**, e0296521 (2022).
25. M. Loddeke *et al.*, Anaerobic Cysteine Degradation and Potential Metabolic Coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **199** (2017).
26. L. Göbbels *et al.*, Cysteine: an overlooked energy and carbon source. *Sci Rep* **11**, 2139 (2021).
27. J. Mendez *et al.*, A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. *J Bacteriol* **193**, 944-951 (2011).
28. H. Gu *et al.*, Novel Cysteine Desulfidase CdsB Involved in Releasing Cysteine Repression of Toxin Synthesis in *Clostridium difficile*. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 531 (2018).
29. W. B. Whitman, J. Shieh, S. Sohn, D. S. Caras, U. Premachandran, Isolation and Characterization of 22 Mesophilic *Methanococci*. *Syst Appl Microbiol* **7**, 235-240 (1986).
30. W. J. Jones, M. J. B. Paynter, R. Gupta, Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch Microbiol* **135**, 91-97 (1983).



31. R. M. Cicchillo *et al.*, Escherichia coli L-serine deaminase requires a [4Fe-4S] cluster in catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 32418-32425 (2004).
32. C. Velours *et al.*, Determination of the Absolute Molar Mass of [Fe-S]-Containing Proteins Using Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *Biomolecules* **12**, 270 (2022).
33. M. J. Morra, W. A. Dick, Mechanisms of H<sub>2</sub>S production from cysteine and cystine by microorganisms isolated from soil by selective enrichment. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1413-1417 (1991).
34. O. Bimai *et al.*, The thiolation of uridine 34 in tRNA, which controls protein translation, depends on a [4Fe-4S]-cluster in *Methanococcus maripaludis*. *Sci Rep* **13**, 5351 (2023).
35. N. He *et al.*, A subclass of archaeal U8-tRNA sulfurases requires a [4Fe-4S] cluster for catalysis. *Nucleic Acids Res* **50**, 12969-12978 (2022).
36. J. Jumper *et al.*, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589 (2021).
37. E. Krissinel, Crystal contacts as nature's docking solutions. *J Comput Chem* **31**, 133-143 (2010).
38. Holm L, Laiho A, Toronen P, S. M, DALI shines a light on remote homologs: one hundred discoveries. *Protein Science* **23**, e4519 (2023).
39. J. B. Thoden, H. M. Holden, G. A. Grant, Structure of L-serine dehydratase from *Legionella pneumophila*: novel use of the C-terminal cysteine as an intrinsic competitive inhibitor. *Biochemistry* **53**, 7615-7624 (2014).
40. H. L. Chun, S. Y. Lee, S. H. Lee, C. S. Lee, H. H. Park, Enzymatic reaction mechanism of cis-aconitate decarboxylase based on the crystal structure of IRG1 from *Bacillus subtilis*. *Sci Rep* **10**, 11305 (2020).
41. B. Lohkamp, B. Bauerle, P. G. Rieger, G. Schneider, Three-dimensional Structure of Iminodisuccinate Epimerase Defines the Fold of the MmgE/PrpD Protein Family. *J Mol Biol* **362**, 555-566 (2006).
42. Y. Yan, G. A. Grant, M. L. Gross, Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry Reveals Unique Conformational and Chemical Transformations Occurring upon [4Fe-4S] Cluster Binding in the Type 2 L-Serine Dehydratase from *Legionella pneumophila*. *Biochemistry* **54**, 5322-5328 (2015).
43. D. Susanti *et al.*, Thioredoxin targets fundamental processes in a methane-producing archaeon, *Methanocaldococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2608-2613 (2014).
44. J. Zhou *et al.*, Structural evidence for a [4Fe-5S] intermediate in the non-redox desulfuration of thiouracil. *Angew Chem Int Ed Engl* **60**, 424-431 (2021).
45. J. Fuchs *et al.*, TudS desulfidases recycle 4-thiouridine-5'-monophosphate at a catalytic [4Fe-4S] cluster *Comm Biol in press* (2023).
46. D. H. Flint, R. M. Allen, Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**, 2315-2334 (1996).
47. A. E. Hofmeister, S. P. Albracht, W. Buckel, Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Lett* **351**, 416-418 (1994).
48. H. Beinert, Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**, 2-15 (2000).

49. B. D. Paul, S. H. Snyder, H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 499-507 (2012).
50. M. Fu *et al.*, Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2943-2948 (2012).
51. S. F. Altschul *et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402 (1997).
52. K. Katoh, D. M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772-780 (2013).
53. S. R. Eddy, Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002195 (2011).
54. M. N. Price, P. S. Dehal, A. P. Arkin, FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**, e9490 (2010).
55. A. Criscuolo, S. Gribaldo, BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* **10**, 210 (2010).
56. L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, A. von Haeseler, B. Q. Minh, IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* **32**, 268-274 (2015).
57. I. Letunic, P. Bork, Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* **49** (2021).
58. Z. Lyu *et al.*, Posttranslational Methylation of Arginine in Methyl Coenzyme M Reductase Has a Profound Impact on both Methanogenesis and Growth of *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* **202**, e00654-00619 (2020).
59. X. Z. Su, Y. Wu, C. D. Sifri, T. E. Wellems, Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Res* **24**, 1574-1575 (1996).
60. P. Dhatwal, S. Mehrotra, R. Mehrotra, Optimization of PCR conditions for amplifying an AT-rich amino acid transporter promoter sequence with high number of tandem repeats from *Arabidopsis thaliana*. *BMC Res Notes* **10**, 638 (2017).
61. F. Long, L. Wang, B. Lupa, W. B. Whitman, A Flexible System for Cultivation of *Methanococcus* and Other Formate-Utilizing Methanogens. *Archaea* **7046026** (2017).
62. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
63. H. Beinert, Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* **131**, 373-378 (1983).
64. W. W. Fish, Rapid Colorimetric Micromethod for the Quantitation of Complexed Iron in Biological Samples. *Methods in Enzymology* **158**, 357-364 (1988).
65. J. N. Burnell, J. A. Karle, A. Shrift, Reduction of DL-selenocystine and isolation of L-selenocysteine. *J Inorg Biochem* **12**, 343-351 (1980).
66. R. G. Duggleby, Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. *Methods Enzymol* **249**, 61-90 (1995).
67. C. Vonrhein *et al.*, Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 293-302 (2011).
68. A. J. McCoy *et al.*, Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* **40**, 658-674 (2007).

69. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
70. P. V. Afonine *et al.*, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 352-367 (2012).
71. G. Bricogne *et al.*, *BUSTER version 2.10.2*. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd. (2016).
72. F. Sievers *et al.*, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539 (2011).
73. P. Gouet, E. Courcelle, D. I. Stuart, F. Metoz, ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308 (1999).
74. F. Gabler *et al.*, Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Curr Protoc Bioinformatics* **72**, e108 (2020).
75. J. A. Bogdan, J. Nazariarriou, J. Sarwar, P. Alexander, M. S. Blake, *Bordetella pertussis* autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine. *Infect. Immun* **69**, 6823 (2001).

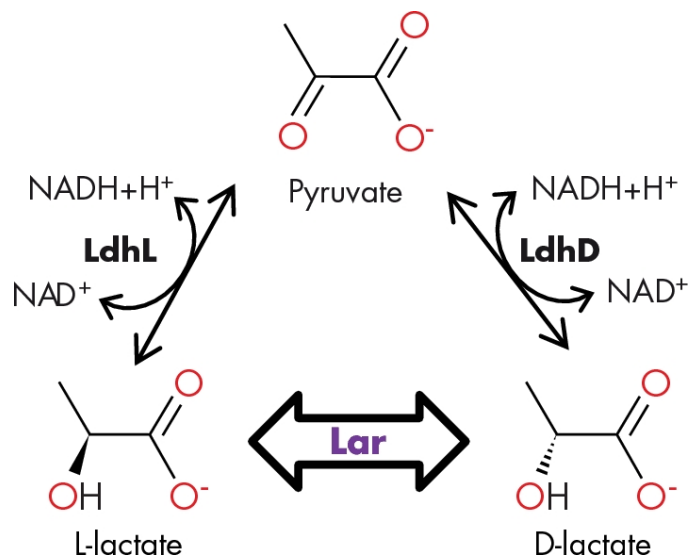
## **Projet 2 : La sulfure transférase LarE de *M. maripaludis*, de l'enzyme suicide à l'enzyme catalytique ?**

Ce deuxième projet porte sur LarE de l'archée *M. maripaludis* (MmLarE), une sulfure transférase impliquée dans la synthèse d'un cofacteur enzymatique soufré, et fait le lien avec la partie 4 de l'introduction en explorant les différents mécanismes d'insertion enzymatique du soufre utilisés par les orthologues de cette enzyme.

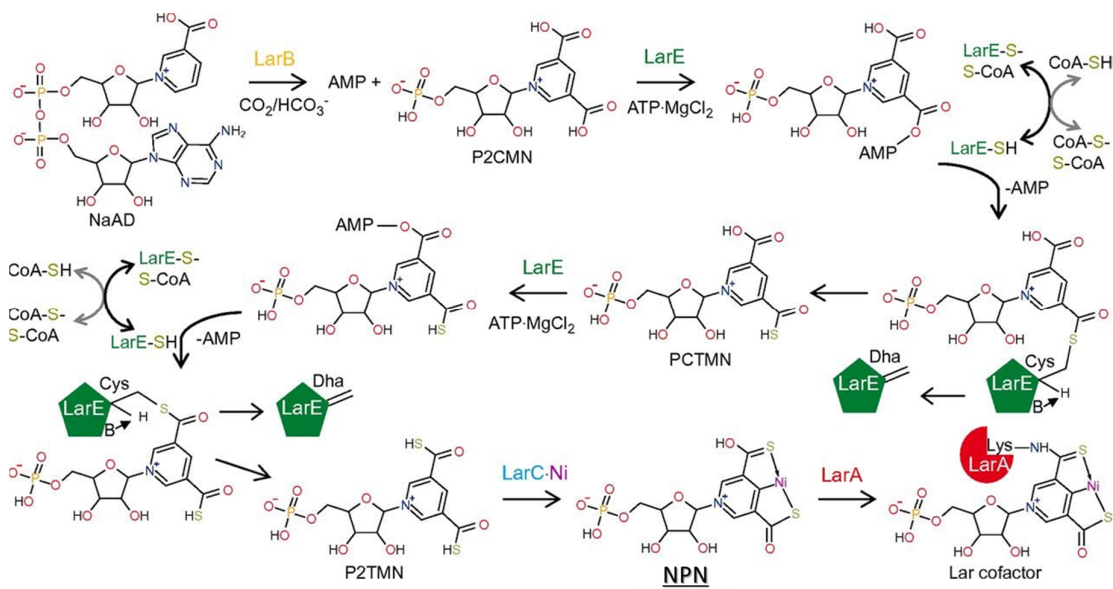
## I. Genèse du projet

LarE est une enzyme de thiolation dépendante de l'ATP qui participe au métabolisme du lactate dans les bactéries et les archées. L'acide lactique, qui se présente sous forme d'isomères L et D, est une molécule organique produite lors du processus de fermentation par deux lactate déshydrogénases stéréospécifiques [Desguin 2016]. Bien que les isomères d'acide lactique soient des produits du métabolisme fermentaire, ils peuvent également être métabolisés par certains microorganismes, tels que les bactéries lactiques [Liu 2003 ; Goffin et al. 2004 ; Fellner 2017]. Chez ces dernières, le D-lactate est par exemple indispensable à la formation de la paroi cellulaire [Ferain, 1996 ; Goffin, 2005].

Le rapport entre les isomères L et D du lactate produit varie selon les espèces bactériennes et est principalement déterminé par l'activité des lactate déshydrogénases (**Figure 53**) [Manome, 1998 ; Desguin, 2017]. De plus, certaines bactéries et archées sont capables d'interconvertir ces énantiomères grâce à une lactate racémase, LarA, incluse dans un opéron *Lar*. Cette voie alternative représente un avantage en permettant aux organismes qui ne possèdent qu'une seule lactate déshydrogénase stéréospécifique d'utiliser ou de produire les deux isomères à partir d'un mélange racémique (**Figure 53**) [Desguin, 2016, 2017, 2020]. À titre d'exemple, LarA est cruciale pour la production de D-lactate nécessaire à la biosynthèse de la paroi cellulaire chez les bactéries qui ne disposent que de la L-lactate déshydrogénase comme les *Lactobacilles* [Goffin, 2005 ; Ferain, 1996]. Les homologues de LarA sont exprimés de façon ubiquitaire dans le microbiote intestinal humain en bonne santé [Chatterjee S., 2016]. Étant donné que le D-lactate peut être impliqué dans l'acidose métabolique chez l'humain, la production de cette enzyme par le microbiote pourrait jouer un rôle dans sa détoxification [Bianchetti, 2017 ; Desguin, 2020]. La lactate racémase catalyse la conversion des isomères de lactate à l'aide d'un cofacteur organométallique, le nucléotide nickel-pincer (NPN) [Desguin, 2014]. La synthèse du NPN résulte de l'action de trois enzymes appartenant à l'opéron *lar*, qui catalysent trois réactions successives (**Figure 54**) [Desguin, 2014, 2015, 2016]. Dans un premier temps, la carboxylase LarB convertit le dinucléotide d'acide nicotinique (NaAD) en mononucléotide d'acide pyrimidinium-3,5-biscarboxylique (P2CMN) [Rankin, 2021]. Ensuite, le P2CMN est converti en acide pyridinium-3,5-bisthiocarboxylique mononucléotide (P2TMN) par l'enzyme qui fait l'objet de ce projet, LarE.



**Figure 53 : Schéma simplifié des voies de synthèse des isomères d'acide lactique** [Desguin, 2016]. (LdhL et LdhD : L- et D-lactate déshydrogénase, respectivement. NAD : nicotinamide adénine dinucléotide. Lar : lactate racémase A).



**Figure 54 : Voie de synthèse du cofacteur NPN de l'enzyme LarA** [Fellner, 2017].

LarE catalyse deux insertions successives de soufre sur les deux groupes carboxylate du cofacteur, produisant d'abord l'acide pyridinium-3-carboxy-5-thiocarboxylique mononucléotide (PCTMN), puis le P2TMN (**Figures 54 et 55**) [Fellner, 2017]. Enfin, LarC insère le nickel manquant, qui se retrouve lié par les deux atomes de soufre et un atome de carbone du cofacteur, produisant ainsi le NPN, qui est le produit final et le cofacteur de LarA [Desguin, 2018].

La caractérisation biochimique et structurale de LarE de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* (LpLarE) a été rapportée en 2017 [Fellner, 2017]. Plusieurs structures de LpLarE ont été obtenues : la protéine seule (PDB code 5UDQ) ou liée à différentes molécules, telles que l'ATP (PDB code 5UDS), l'AMP (PDB code 5UDT), ou le nicotinamide mononucléotide (NMN, PDB code 5UDR), un analogue du substrat. Cette dernière structure a notamment été utilisée pour modéliser une molécule de P2CMN dans le site de liaison du substrat [Fellner, 2017]. Le domaine N-terminal (N-ter) de LpLarE contient le motif conservé appelé PP-loop, qui sert à la liaison de l'ATP, indiquant que l'enzyme appartient à la superfamille des ATP pyrophosphatases [Desguin, 2018]. À l'instar des enzymes de thiolation, telles que TtuA, détaillées en partie 4 et appartenant à cette même famille d'ATPases, l'ATP est utilisé au cours de la première étape de la réaction de thiolation pour adénylyler le substrat, activant ainsi le carboxylate cible pour l'insertion du soufre. Le mécanisme proposé pour LpLarE débute par une attaque nucléophile d'un groupement carboxylate du P2CMN sur l' $\alpha$ -phosphate de l'ATP, conduisant à la formation de l'intermédiaire adénylylé et à la libération de pyrophosphate (**Figure 55**) [Fellner, 2017]. Ce mécanisme est en accord avec la superposition de la structure liée à l'ATP et du modèle lié au P2CMN, qui montre que l'oxygène du carboxylate du P2CMN est situé à une distance de 4,6 Å du phosphore  $\alpha$  de l'ATP (**Figure 56A**) [Fellner, 2017].

De façon surprenante, c'est le groupement thiol d'un résidu cystéine conservé, la cystéine-176 (Cys176), qui fournit l'atome de soufre nécessaire à la thiolation du P2CMN par LpLarE. Cette cystéine agit comme nucléophile pour attaquer le substrat adénylylé, entraînant la formation d'un résidu de déhydroalanine (Dha) en position 176 dans LpLarE [Fellner, 2017]. Le mécanisme proposé est qualifié de "sacrificiel", car cette Cys176 n'est pas régénérée après le cycle de catalyse. Cette proposition se base sur l'analyse des sites actifs des structures de LpLarE contenant les différents substrats, ainsi que sur des tests d'activité enzymatique in vitro couplés à de la spectrométrie de masse [Desguin, 2016 ; Fellner, 2017].

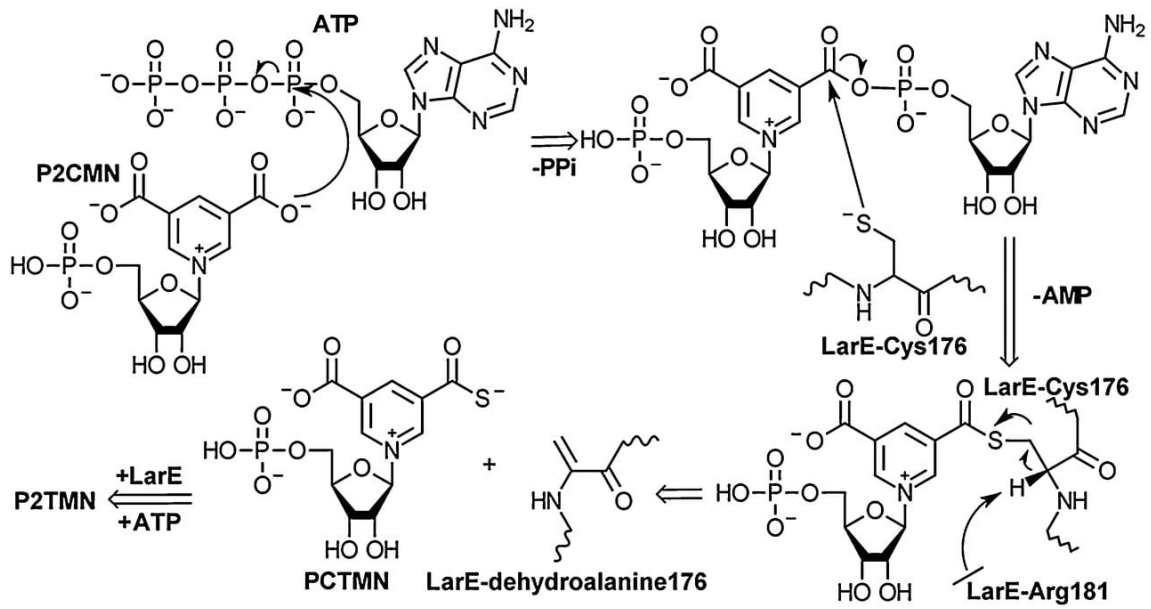


Figure 55 : Schéma du mécanisme catalytique proposé pour LpLarE [Fellner, 2017].

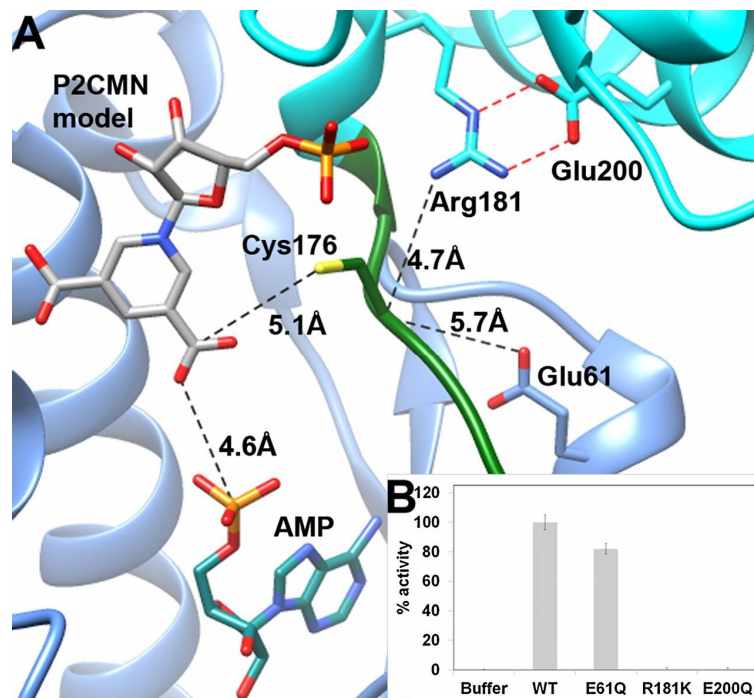
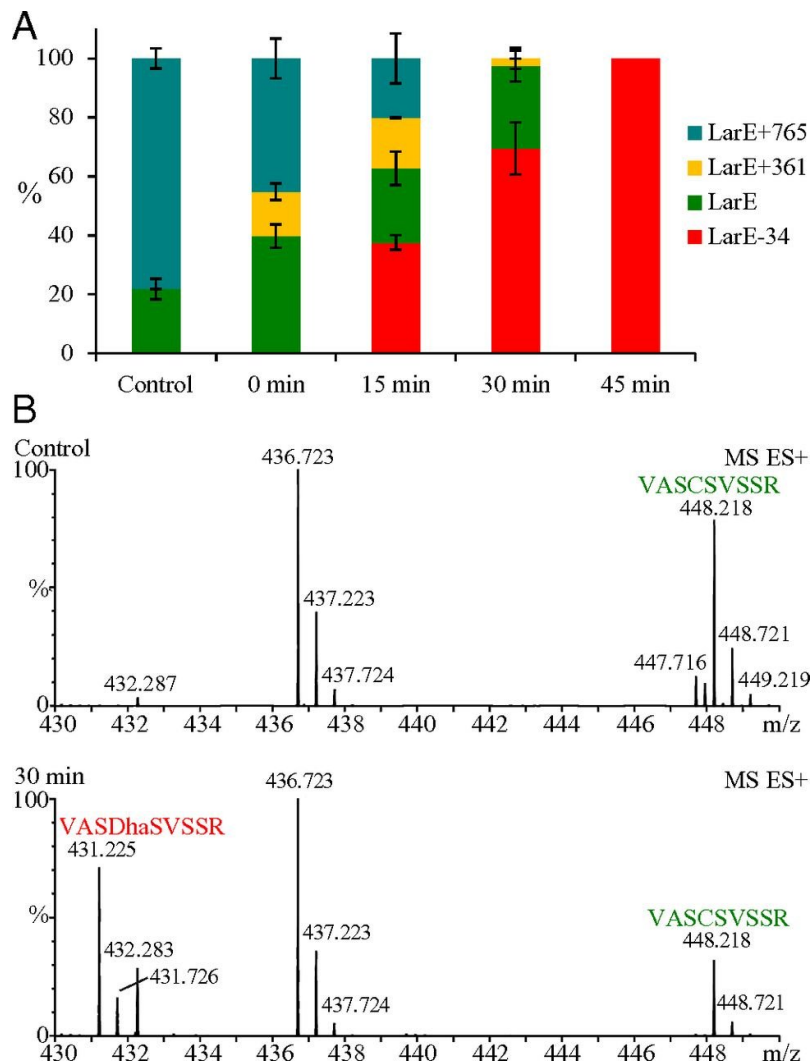


Figure 56 : (A) Modèle du complexe de LpLarE liée au P2CMN. (B) Mesure de l'activité enzymatique des mutants de LpLarE par rapport au WT. [Fellner, 2017]



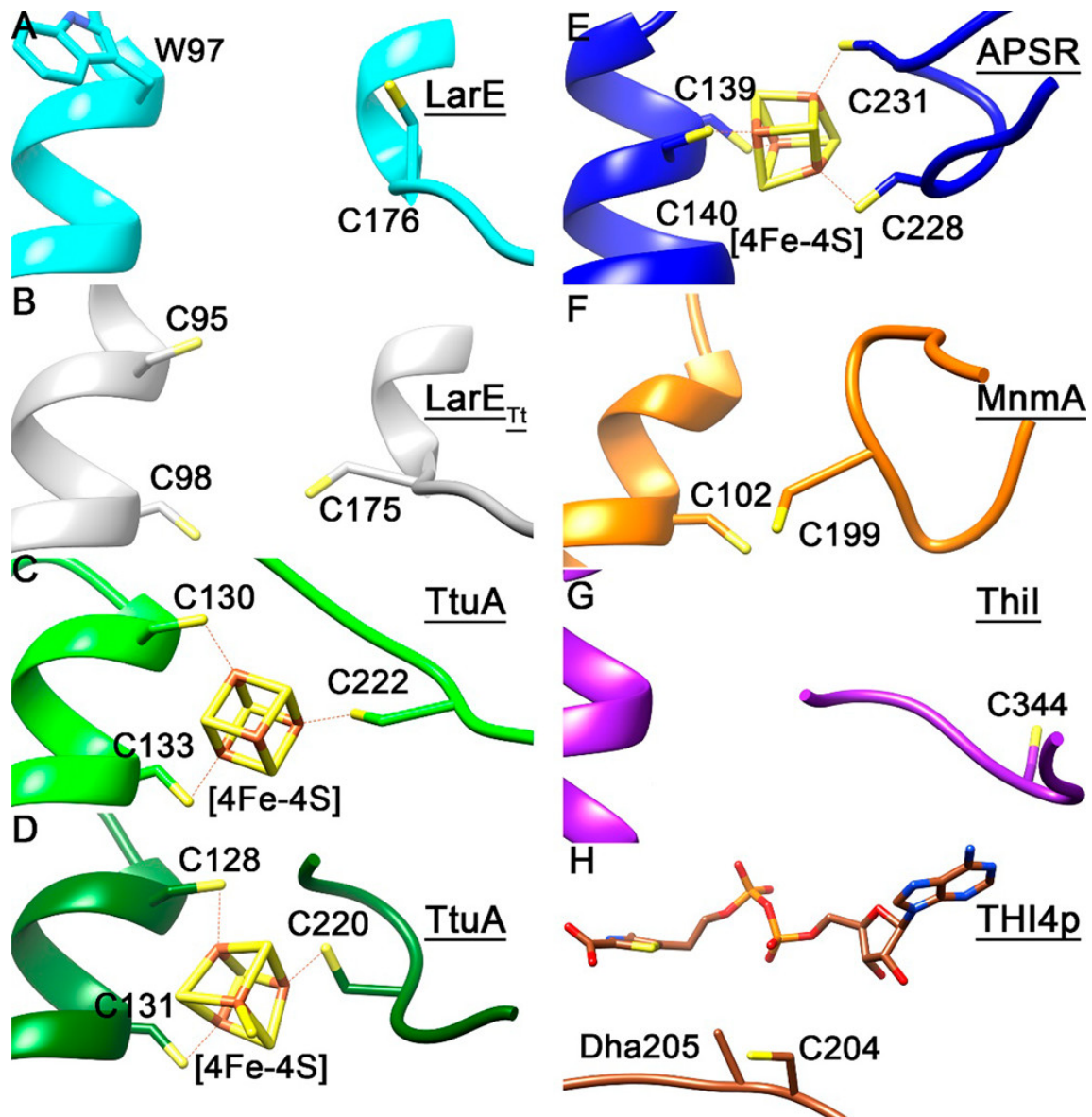
Pour les tests d'activité, le substrat de LarE, le P2CMN, qui n'est pas disponible dans le commerce et est difficile à synthétiser, était obtenu en incubant un extrait cellulaire d'une souche surproduisant la protéine LarB avec de l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) et du bicarbonate de sodium (**Figure 54**). À ce mélange réactionnel était ensuite ajoutée l'enzyme LpLarE recombinante. Pour suivre la formation du produit P2TMN, le mélange réactionnel était complété avec les enzymes LarC et LarA recombinantes, permettant ainsi la formation de D-lactate, lequel pouvait être quantifié via un kit commercial. En parallèle, une analyse LC-ESI-MS du mélange réactionnel, contenant à la fois LarB, LpLarE et de l'ATP, a révélé la formation d'un adduit entre le substrat et l'enzyme. Ceci était suivi de l'apparition d'une forme LarE d'une masse inférieure de 34 Da par rapport à la protéine initiale, correspondant à la perte du groupement thiol de la cystéine et s'accompagnant de la conversion du P2CMN en P2TMN (**Figure 57**) [Desguin, 2016]. De plus, le modèle du complexe de LpLarE avec le P2CMN montre une distance de 5,1 Å entre l'atome de soufre de la Cys176 et le carbone du groupe carboxyle le plus proche dans le P2CMN (**Figure 56A**) [Fellner, 2017]. Il a également été suggéré que le résidu conservé arginine-181 (Arg181), dont le NH1 du groupement guanidinium est à une distance de 4,7 Å du carbone C $\alpha$  de la Cys176 (**Figure 56A**), pourrait agir comme base pour déprotoner cette cystéine, aidé par le glutamate-200 (Glu200) avec lequel il forme une interaction ionique. En accord avec cette hypothèse, la mutagenèse dirigée du résidu Arg181 en lysine et du résidu Glu200 en glutamine entraîne l'inactivation de l'enzyme (**Figure 56B**). L'utilisation d'une arginine comme base a déjà été rapportée dans d'autres familles d'enzymes, telles que les fumarate réductases ou les L-aspartate oxydases [Schlippe, 2005]. Il a donc été proposé que le transfert de soufre se produise via une réaction de  $\beta$ -élimination, catalysée par Arg181 et assistée par Glu200, qui implique la déprotonation du C $\alpha$  de la Cys176, activant ainsi le thiol de la cystéine (**Figures 55 et 56A**) [Fellner, 2017].

Une étude bioinformatique effectuée en 2016 a montré que, parmi les 1 087 génomes de bactéries et d'archées analysés, 270 contenaient le gène d'un homologue de LarE, associé en opéron avec *larB* et *larC* [Desguin, 2016]. Neuf de ces homologues, provenant de *Lactobacillales* ou de *Bacillales*, contiennent une seule cystéine conservée équivalente à la Cys176 de LpLarE [Desguin, 2016]. Les 261 homologues restants, identifiés chez certaines archées et bactéries telles que les *actinobactéries*, les  *$\alpha$ -protéobactéries*, les *cyanobactéries* ou les *euryarchaeota*, possèdent également cette cystéine conservée mais celle-ci est contenue dans un motif "CXXC+C" incluant deux cystéines conservées supplémentaires, absentes dans la séquence de LpLarE [Desguin, 2016 ; Fellner, 2017].



**Figure 57 : Transfert sacrificiel de soufre de LarE au substrat P2CMN [Fellner, 2017].** (A) Pourcentage de chaque forme de LarE observée par LC-MS-ESI avant (Contrôle) et à 0, 15, 30, et 45 min après l'ajout de P2CMN. (B) LC-ESI-MS du peptide 173-181 de LarE avant (en haut) et 30 minutes après (en bas) l'ajout de P2CMN. Les séquences des peptides analysées par LC-ESI-MS/MS sont indiquées au-dessus des pics correspondants.

Or, ce motif conservé est également présent chez des enzymes qui lient un cluster [Fe-S] catalytique, à l'instar des enzymes de thiolations de l'ARNt comme TtuA - mentionnée dans la partie 4 de l'introduction - qui utilise un [4Fe-4S] lié par trois cystéines pour catalyser la thiolation de la 2-thiouridine et qui appartient à la même famille d'ATPases que LarE [Arragain, 2017]. Dans un article ultérieur, la position des cystéines conservées a été comparée dans la structure de LpLarE, un modèle de LarE de *T. thermosaccharolyticum* qui possède les trois cystéines conservées, et la structure de TtuA de *T. thermophilus* (**Figure 58**) [Fellner, 2018 ; Chen, 2017]. La similarité des positions des résidus liant le cluster [4Fe-4S] de TtuA et des cystéines de LarE de *T. thermosaccharolyticum* suggère que cette dernière protéine pourrait lier un cluster [Fe-S] [Fellner, 2018]. Il a ainsi été proposé que les orthologues de LarE contenant le motif conservé CXXC+C puissent lier un cluster [Fe-S] et, par conséquent, qu'ils utilisent un mécanisme d'insertion de soufre différent du mécanisme sacrificiel utilisé par LpLarE [Fellner, 2018].



**Figure 58 : Comparaison des sites actifs de diverses sulfure transférases [Fellner, 2018].**

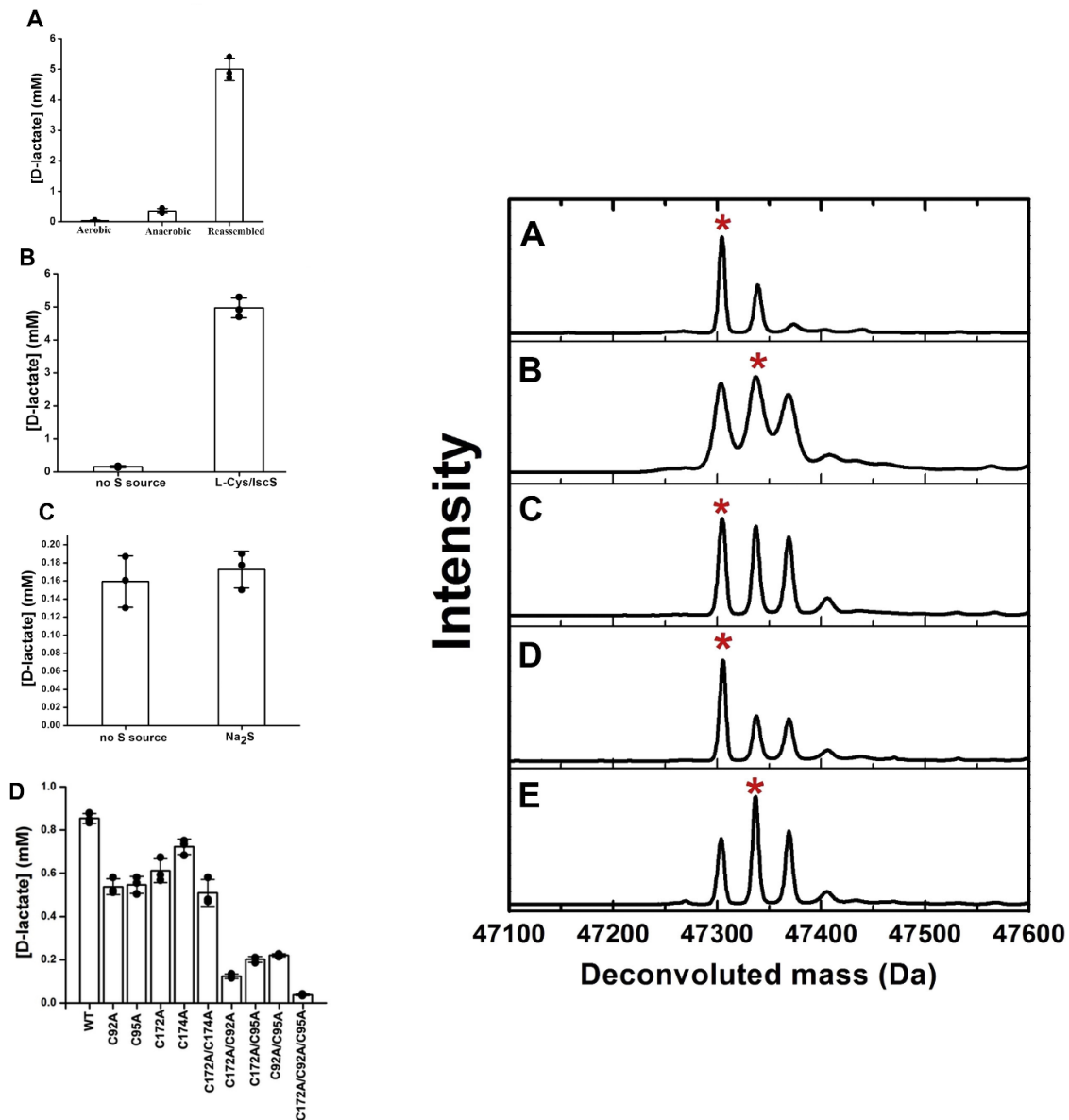
(A) LarE de *L. plantarum* (code PDB 5UDR). (B) Modèle structural de LarE<sub>Tt</sub> de *T. thermosaccharolyticum* (C) 2-Thiouridine synthétase (TtuA) de *T. thermophilus* (code PDB 5B4E). (D) TtuA de *P. horikoshi* (code PDB 5MKP). (E) Adénosine 5'-phosphosulfate réductase de *Ps. aeruginosa* (entr code ée PDB 2GOY). (F) ARNt 2-thiouridylase (MnmA) de *E. coli* (code PDB 2DEU). (G) ARNt 4-thiouridine synthétase (ThiI) de *T. maritima* (code PDB 4KR6). (H) Thiazole synthase (THI4p) de *S. cerevisiae* avec un thiazole adénylylé lié (code PDB 3FPZ).

## II. Problématique du projet

Afin d'explorer cette hypothèse, ce projet s'est focalisé sur l'étude de LarE de *Methanococcus maripaludis* (MmLarE), la même archée que celle impliquée dans le projet CyuA, qui présente 27 % d'identité de séquence avec LpLarE ainsi que les trois cystéines conservées. Le laboratoire CPB ayant l'expertise nécessaire pour faire de la cristallographie aux rayons X sur les protéines à centre [Fe-S], l'objectif était de caractériser biochimiquement et structurellement MmLarE. Ceci afin de déterminer si cette enzyme pouvait représenter une nouvelle classe de protéines LarE, capables de lier un cluster [Fe-S] catalytique, et de comprendre son mécanisme réactionnel. Nous espérions également que la comparaison d'éventuelles structures de MmLarE avec celles déjà disponibles pour LpLarE permettrait de comprendre les points communs et les différences entre ces deux types d'enzymes catalysant une même réaction.

Cependant, au cours de la réalisation du projet, une caractérisation biochimique de LarE de *Thermotoga maritima* (TmLarE) a été publiée [Chatterjee, 2022]. Présentant le motif conservé CXXC+C, TmLarE appartient à la même classe d'enzymes que MmLarE, et partage 30 % d'identité de séquence avec elle [Chatterjee, 2022]. Les tests d'activité sur TmLarE recombinante ont été réalisés suivant la même méthodologie que pour la LpLarE mentionnée précédemment, soit par une mesure directe du produit par LC-ESI-MS soit par une mesure indirecte via la quantification du D-Lactate final. Dans les deux cas, le produit P2TMN était détecté sans ajout d'une source de soufre exogène. À la différence de LpLarE, la masse de TmLarE mesurée par native nano-ESI-MS en présence du substrat reste stable durant la réaction, suggérant qu'il n'y a pas de perte d'un atome de soufre d'une cystéine sacrificielle [Chatterjee, 2022]. Lorsque la protéine TmLarE recombinante est purifiée en anaérobie et incubée avec une source de fer et de cystéine en condition réductrice— conditions permettant la reconstitution in vitro d'un cluster [Fe-S] — les spectres d'absorption UV-visible et EPR observés sont caractéristiques d'un cluster [4Fe-4S] [Chatterjee, 2022].

Par ailleurs, la mutation en alanine de trois résidus cystéine conservés (Cys92, Cys95 et Cys172) entraîne une diminution drastique de l'activité enzymatique (**Figure 59D**) [Chatterjee, 2022]. Une telle perte de l'activité enzymatique de TmLarE est également observée lorsque l'enzyme est exposée à l'oxygène, ce qui conduit à la dégradation du cluster [Fe-S] (**Figure 59A**). Sur la base de ces observations, il a été proposé que la protéine TmLarE lie un cluster [4Fe-4S] catalytique via ces trois cystéines conservées [Chatterjee, 2022].



**Figure 59 (Gauche) Tests d'activité enzymatique de TmLarE** [Chatterjee, 2022]. (A) Comparaison de l'activité pour trois préparations différentes de TmLarE : purifiée en conditions aérobies, anaérobies, ou purifiée et soumise à des conditions de reconstitution du cluster [Fe-S] en anaérobiose (holo-TmLarE). (B) Effet de l'ajout de 10 mM L-Cys et 20  $\mu$ M de IscS sur l'activité de TmLarE (C) Effet de l'ajout de 10 mM Na<sub>2</sub>S sur l'activité de TmLarE (D) Comparaison de l'activité de TmLarE avec les mutants cystéine.

**Figure 60 (Droite) Transfert de soufre de IscS à TmLarE** [Chatterjee, 2022]. Résultats de l'ESI-MS pour : (A) IscS purifiée, (B) IscS purifiée incubée avec de la cystéine pour produire la forme persulfurée de IscS (IscS-S), (C) IscS-S incubée avec TmLarE purifié en aérobiose, (D) IscS-S incubée avec holo-TmLarE en anaérobiose, et (E) IscS-S incubée avec de l'albumine de sérum bovin. Les principaux pics sont indiqués par des étoiles rouges.

Les auteurs ont également examiné la possibilité que la cystéine désulfurase IscS d'*E. coli* puisse transférer le soufre de la cystéine à TmLarE en condition anaérobie [Chatterjee 2022]. La présence d'IscS et de L-cystéine dans le mélange réactionnel conduit à une augmentation d'un facteur 4 de la production du produit P2TMN par TmLarE, suggérant un transfert de soufre entre les deux protéines (**Figure 59B**) [Chatterjee 2022]. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'aucun phénomène similaire n'est observé lors de l'incubation avec une source de soufre telle que Na<sub>2</sub>S (**Figure 59C**). Par ailleurs, une analyse par ESI-MS révèle que le persulfure formé sur IscS (après incubation de IscS en présence de cystéine) disparaît lors de l'incubation avec holo-TmLarE, suggérant que le persulfure d'IscS est transféré au cluster [4Fe-4S] de TmLarE, conduisant à la formation d'un centre [4Fe-5S] [Chatterjee 2022]. (**Figure 60**). De plus, des analyses de ce même mélange réactionnel par ESI-MS en conditions natives ont permis d'obtenir la masse exacte de TmLarE et donc la stœchiométrie en fer et soufre associée aux sous-unités. Les spectres montrent des pics correspondant à holo-TmLarE dont la masse est augmentée de 32 Da, pouvant correspondre à la forme [4Fe-5S] créée après transfert du soufre par IscS-SH. Néanmoins, ce pic pourrait également être attribué à des molécules de TmLarE contenant un cluster [4Fe-4S] ainsi qu'un persulfure sur la quatrième cystéine de la protéine, non liée au cluster [Chatterjee, 2022]. Suite à la caractérisation biochimique de TmLarE, un mécanisme catalytique similaire à celui de l'enzyme de thiolation TtuA, décrit dans la Partie 4 de l'introduction [Arragain, 2017], a été proposé. Selon ce mécanisme, l'enzyme utiliserait un cluster [4Fe-4S], lié par trois cystéines, dont le quatrième fer non lié pourrait coordonner un atome de soufre exogène. L'espèce [4Fe-5S] ainsi formée transférerait le soufre additionnel au substrat adénylé (**Figure 61**) [Chatterjee, 2022].

Bien que l'étude biochimique de TmLarE semble, à première vue, avoir empiété sur mon projet initial relatif à MmLarE — en particulier en ce qui concerne la caractérisation spectroscopique du cluster —, la structure cristallographique de TmLarE n'avait pas été résolue. L'étude structurale de MmLarE vient donc compléter les études biochimiques menées sur TmLarE afin d'approfondir la compréhension du mécanisme catalytique employé par cette classe de LarE qui lie un cluster [Fe-S] et dont la découverte est récente. De plus, les tests d'activité de TmLarE avaient montré que le cluster était nécessaire à la catalyse. Il n'était donc plus indispensable de réaliser ces essais sur MmLarE. La mise en place du test d'activité au laboratoire, suivant le protocole préalablement décrit, aurait été laborieuse du fait de l'absence des souches bactériennes et des protéines recombinantes nécessaires.

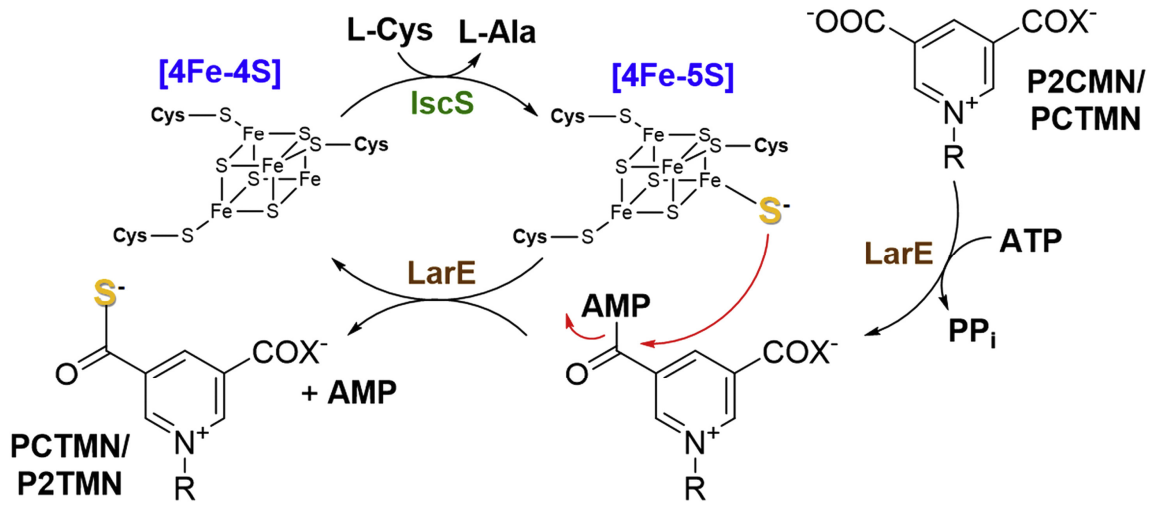


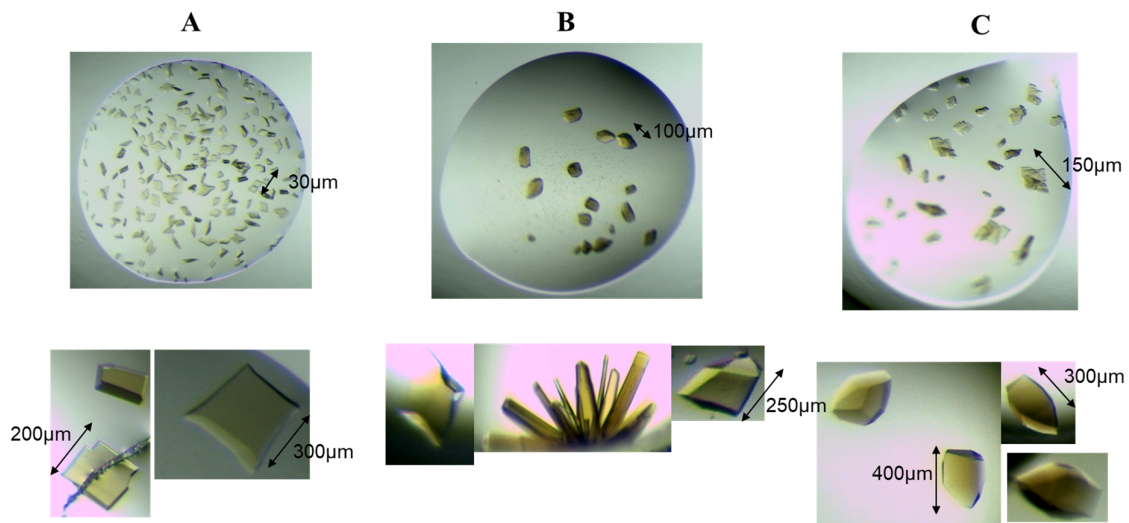
Figure 61 Mécanisme catalytique proposé pour TmLarE. D'après [Chatterjee 2022]



### III. Déroulement du projet

La caractérisation de MmLarE s'inscrit dans le cadre d'un nouveau projet au sein du laboratoire, habituellement axé sur l'étude des enzymes de modification de l'ARNt, et constitue les premiers travaux réalisés au cours de cette thèse. Ce projet a ainsi nécessité la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la détermination de la structure cristallographique de la protéine. Cela inclut l'expression de la protéine MmLarE recombinante, sa purification, la reconstitution *in vitro* du cluster [Fe-S] et sa caractérisation spectroscopique, suivie de la cristallisation de la protéine et de la détermination de sa structure. Enfin, des modèles structuraux des intermédiaires catalytiques de MmLarE et LpLarE ont été conçus *in silico* en s'appuyant sur les structures obtenues.

J'ai purifié la protéine recombinante MmLarE, exprimée avec un tag histidine (6-His) clivable en N-terminal dans des conditions aérobies par chromatographie d'affinité au nickel, suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique (Article 2, Figure S2A et B). Un spectre d'absorption UV-visible, ainsi qu'une quantification du Fe dans la protéine purifiée, indiquent qu'elle est dépourvue de cluster [Fe-S] (Article 2, Figure 2A) ; elle est dès lors désignée sous le terme apo-MmLarE. Afin de vérifier la capacité de MmLarE à lier un centre [Fe-S], j'ai réalisé des essais de reconstitution du cluster *in vitro* dans des conditions anaérobies strictes en incubant apo-MmLarE avec un excès de fer et une source de soufre, à savoir la L-cystéine et la cystéine désulfurase CsdA, en présence d'un agent réducteur, le dithiothréitol. La protéine ainsi obtenue, contenant un cluster [Fe-S] (nommée holo-MmLarE), a ensuite été purifiée par chromatographie d'exclusion stérique dans des conditions anaérobies (Article 2, Figure S3A). La quantification du fer dans l'holo-MmLarE purifiée révèle que la protéine reconstituée contient approximativement 3,1 atomes de Fe par monomère. De plus, son spectre d'absorption UV-visible montre une absorption spécifique autour de 400 nm, caractéristique d'un cluster [4Fe-4S] (Article 2, Figure 2A). En utilisant du  $Fe^{57}$  pour reconstituer holo-MmLarE, nous avons pu effectuer une caractérisation supplémentaire du cluster par spectrométrie Mössbauer, en collaboration avec Jonathan Oltmanns du laboratoire de Volker Schünemann (TU Kaiserslautern, Allemagne). Le spectre Mössbauer obtenu confirme la présence d'une seule espèce de cluster dont les paramètres correspondent à un  $[4Fe-4S]^{2+}$  diamagnétique (Article 2, Figure S4 et Table S1).



**Figure 62 : Optimisation de trois conditions de cristallisation distinctes pour holo-MmLarE. En haut, cristaux obtenus via un criblage avec des kits commerciaux. En bas, cristaux obtenus après une optimisation manuelle de chaque condition. L'agent précipitant pour chaque condition : (A) NaCl, (B) PEG 4000, et (C) Sulfate d'ammonium (Cf Article, Material and methods)**

## Projet 2 : Étude de la sulfurtransférase LarE - Déroulement

Un premier criblage des conditions de cristallogenèse a été réalisé pour holo-MmLarE dans des conditions anaérobies. L'analyse au synchrotron a montré que beaucoup de cristaux ne diffractaient pas, mais que certains diffractaient à une résolution de 6-8 Å. L'analyse au synchrotron a montré que beaucoup de cristaux ne diffractaient pas, mais que certains diffractaient à une résolution de 6-8 Å. Trois conditions de cristallisation issues de ce criblage ont ensuite été optimisées en variant les concentrations des agents précipitants, en ajoutant des additifs et en modifiant le pH de la solution de cristallisation. (**Figure 62**) (Article 2, Material and methods). Les meilleures données de diffraction ont été obtenues avec une condition constituée principalement de chlorure de sodium, atteignant une résolution maximale de 3.2 Å (Article 2, Table 1).

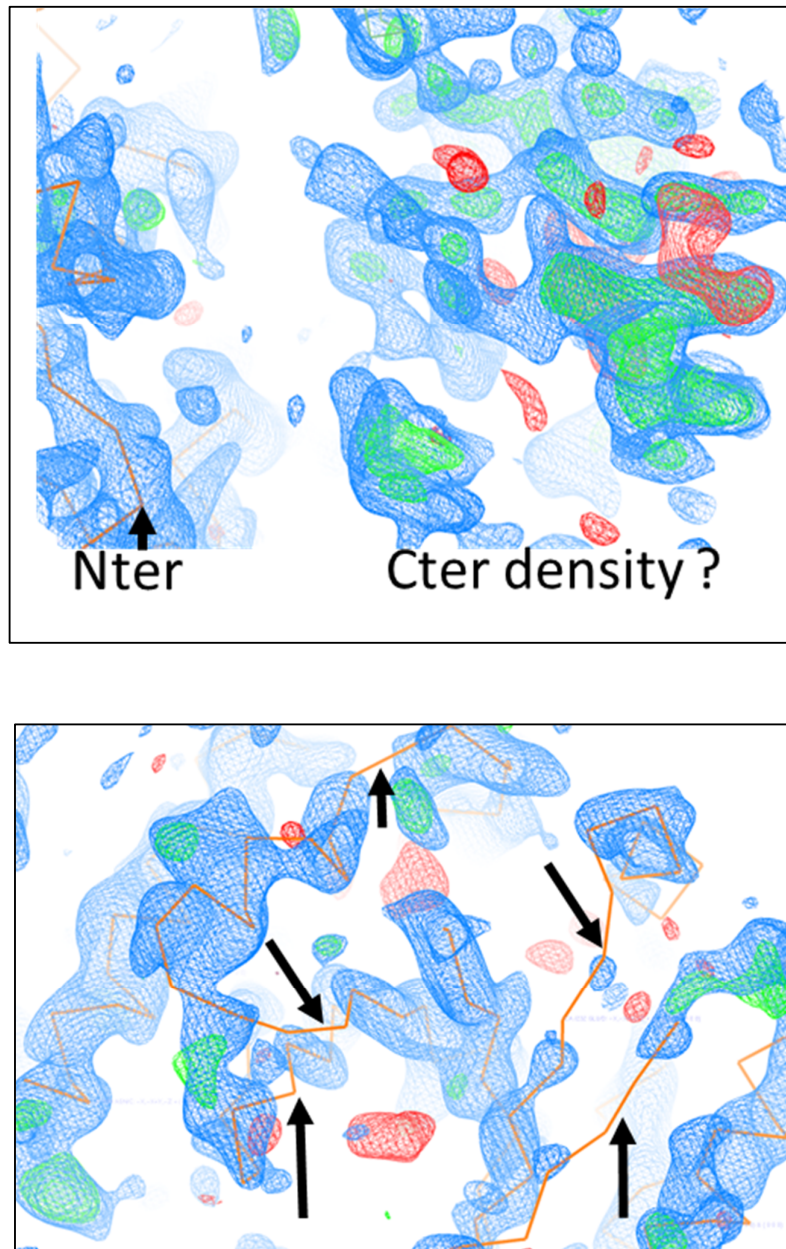
Pour déterminer la structure cristallographique de holo-MmLarE, nous avons initialement tenté le phasage par remplacement moléculaire en utilisant la structure de LpLarE. Cependant, que ce soit en utilisant la structure complète ou en la fractionnant en deux domaines distincts, N-terminal (N-ter) et C-terminal (C-ter), cette approche s'est avérée infructueuse. Le problème de phase a finalement été résolu via la technique SAD (Single-wavelength anomalous dispersion), en exploitant la diffraction anormale des atomes de fer présents dans le cluster [4Fe-4S] de la protéine (collaboration avec le Dr. Ludovic Pecqueur). Le signal anormal résultant, enregistré jusqu'à une résolution de 4.5 Å, a permis de calculer une carte de densité électronique expérimentale, utilisée ultérieurement pour construire le squelette carboné de la protéine. Ce modèle a constitué le point de départ menant à la complétion et à l'affinement de deux structures de holo-MmLarE, avec une résolution de 3.6 et 3.2 Å, respectivement (Article 2, Table 1 : Cristaux 1 et 2). L'empilement cristallin révèle un assemblage d'heptamères de dimères avec une unité asymétrique composée de sept monomères (Article 2, figure S5 et 3A). Compte tenu du grand nombre de molécules dans l'unité asymétrique et de la résolution moyenne des jeux de données, l'affinement de la structure de holo-MmLarE s'est avéré complexe, et il était difficile d'améliorer les facteurs d'accord cristallographiques en dessous de 0.39 ( $R_{\text{free}}$ ). Des tentatives d'optimisation supplémentaires en utilisant des techniques comme le macro/micro-seeding, n'ont pas permis d'améliorer la résolution.



**Figure 63** : Cristaux de apo-MmLarE obtenus après optimisation manuelle des conditions de cristallisation dont le sulfate d'ammonium est le principal agent précipitant (Article, Material and methods)

## Projet 2 : Étude de la sulfurtransférase LarE - Déroulement

Des essais de cristallisation de l'apo-MmLarE ont été menés en condition aérobie, en présence ou non d'AMP ou d'adénylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP), un analogue non hydrolysable de l'ATP, avec l'espoir d'obtenir des cristaux diffractant à meilleure résolution, permettant d'affiner plus facilement la structure. Des cristaux ont été obtenus avec une condition de cristallisation contenant principalement de l'ammonium sulfate et exclusivement en présence d'AMP-PNP (Article 2, Material and methods). L'optimisation des conditions de cristallisation, notamment par l'utilisation de tampons à différents pH et l'ajout d'additifs, a permis d'obtenir des cristaux diffractant à une résolution de 2,35 Å, contenant deux molécules par unité asymétrique (**Figure 63**) (Article 2, Table 1). La structure de holo-MmLarE a été utilisée pour essayer de résoudre la structure de apo-LarE par remplacement moléculaire. Cependant, l'échec du remplacement moléculaire avec les programmes Phaser ou Molrep, en utilisant comme modèle la molécule entière de holo-MmLarE, a nécessité de rechercher les domaines N-ter et C-ter séparément. Initialement, seuls les deux domaines N-ter ont pu être positionnés à l'aide du logiciel Phaser [McCoy, 2007]. L'affinement s'est accompagné de l'apparition d'une zone de densité électronique non attribuée, suggérant la présence des domaines C-ter (**Figure 64**). Après plusieurs tentatives infructueuses pour positionner les domaines manquants dans cette densité avec *Phaser*, une solution a été trouvée grâce au logiciel *Molrep* et sa fonction « Spherically Averaged Phased Translation Function » (*SAPTF*), selon [Vagin, 2001]. Toutefois, une incompréhension de l'empilement cristallin et de l'organisation des domaines de la protéine, combinée à une faible densité électronique dans la zone C-ter, nous a contraints à suspendre l'affinement de cette structure (**Figure 64**). Et ce, malgré le recours à certaines options d'affinement spécifiques pour ce type de situation, telles que l'affinement DEN (deformable elastic network) [Schröder, 2014]. Malgré de multiples tentatives d'optimisation des conditions de cristallisation, incluant l'emploi de kits commerciaux d'additifs contenant des atomes lourds pour « stabiliser » le domaine C-terminal ou pour modifier le groupe d'espace cristallin, ces efforts se sont avérés infructueux.

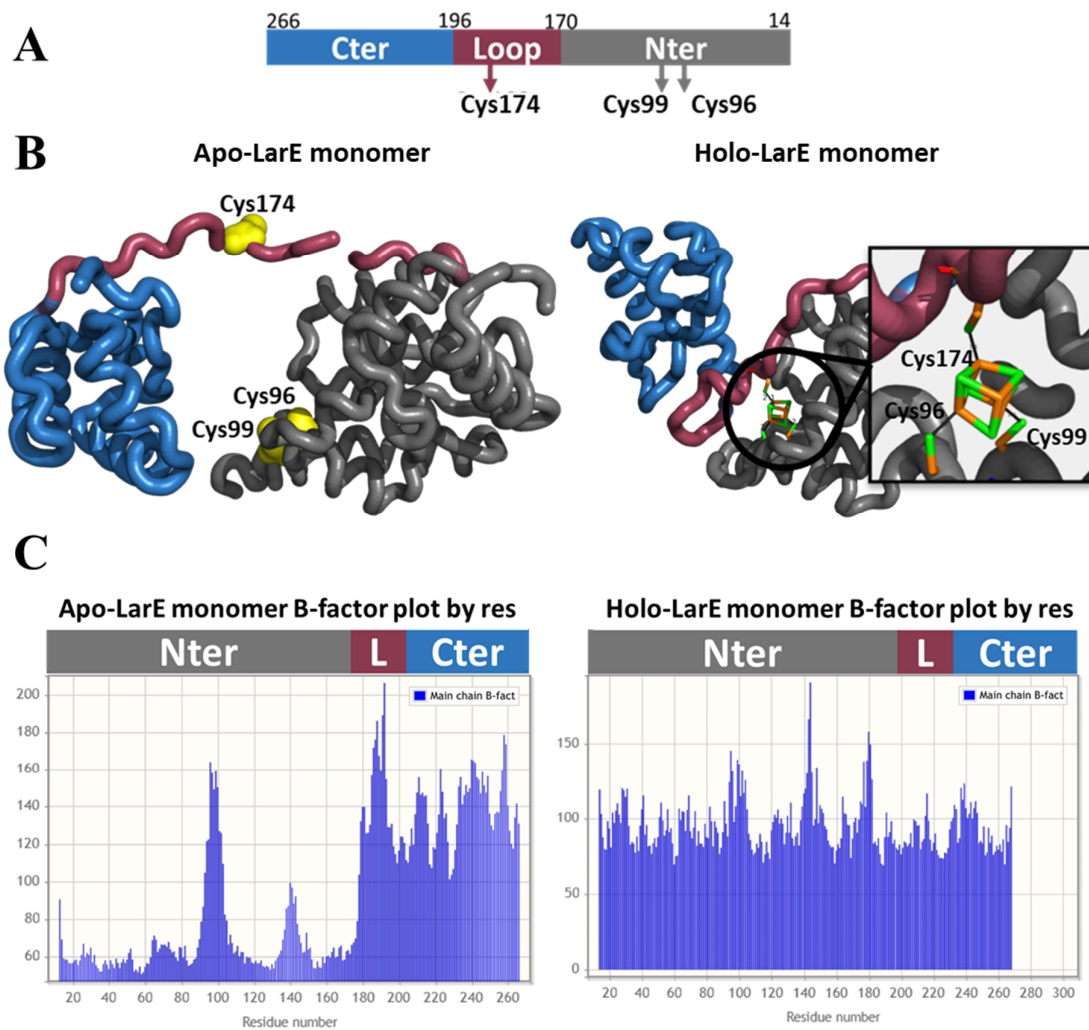


**Figure 64** : Carte de densité électronique  $2Fo-Fc$  ( $1\sigma$ ) à différentes étapes de la résolution de la structure de apo-MmLarE. (**Haut**) Densité électronique après l'affinement des deux domaines N-terminaux identifiés par remplacement moléculaire avec le logiciel Phaser. (**Bas**) visualisation du domaine C-terminal après son placement par remplacement moléculaire grâce au logiciel Molrep avec la fonction SAPTF. Les flèches indiquent des zones présentant une faible densité électronique.

## Projet 2 : Étude de la sulfurtransférase LarE - Déroulement

La situation s'est débloquée fin 2021 lors de ma participation à un atelier de cristallographie (DLS-CCP4 Workshop), durant lequel j'ai pu travailler sur mes données cristallographiques de apo-MmLarE. Une solution convaincante concernant l'agencement des domaines de la protéine a alors été trouvée avec l'aide du Dr A. Lebedev (Rutherford Appleton Laboratory, UK). Les difficultés rencontrées auparavant pourraient être attribuables à la mobilité du domaine C-ter, comme en témoignent les facteurs B des résidus correspondants par rapport à ceux du domaine N-ter (**Figure 65C**) (Article 2, figure S8B). Il en découle que, contrairement à la structure de holo-MmLarE, les domaines C-terminaux de l'apo-MmLarE ne contribuent pas à la dimerisation de la protéine et adoptent une configuration distincte, tant vis-à-vis de l'un l'autre que par rapport à ceux dans la structure de holo-MmLarE. De plus, en l'absence du cluster [Fe-S], les domaines N et C-terminaux de l'apo-MmLarE sont reliés par une longue boucle non structurée (**Figure 65**). Cette boucle forme un pont disulfure intermoléculaire entre les cystéines 174 et 96 de chaque monomère, toutes deux impliquées dans la liaison du cluster chez holo-MmLarE (Article 2, Figure 5D). L'existence de ce pont disulfure, malgré la présence de réducteur (5 mM 2-mercaptoethanol) dans le tampon utilisé durant la purification et cristallisation de l'enzyme, a été confirmée en solution par spectrométrie de masse native (LC-MS) qui révèle une masse correspondant à un dimère (Article 2, Figure S7B). Dans la structure de l'apo-MmLarE, l'analogue non hydrolysable de l'ATP (AMP-PNP) utilisé en co-cristallisation est observé dans le site actif de l'enzyme et présente deux conformations alternatives de son phosphate  $\gamma$  (Article 2, Figure 5E). La structure finale de apo-MmLarE, affinée jusqu'à une résolution de 2.35 Å ( $R = 0.23$ ,  $R_{\text{free}} = 0.25$ ), a ensuite pu être utilisée pour finir l'affinement de la structure de holo-MmLarE dont la résolution est plus basse.

Au total, trois structures de MmLarE (8CNZ, 8CP4 et 8CP3), correspondant à deux jeux de données différents de Holo-MmLarE et un de Apo-MmLarE, ont été affinées et déposées dans la PDB (Article 2, Tableau 1). Dans chacun des sept monomères de la structure de holo-MmLarE, le cluster [4Fe-4S] est situé à l'interface entre les domaines N-ter et C-ter, et est lié par les trois cystéines conservées, Cys96, Cys99 et Cys174 (**Figure 65**) (Article 2, Figure 4A). Dans le site actif d'une des molécules de l'unité asymétrique (A), une densité électronique proche du quatrième atome de fer du cluster — non lié à la protéine — a été attribuée à de l'AMP, produit de la réaction catalysée par LarE, lié par deux oxygènes de son groupement phosphate à l'atome de fer (Article 2, Figure 4B).



**Figure 65 : Comparaison de la molécule A de la structure de apo-MmLarE et holoMmLarE (A) Schéma simplifié de l'organisation des domaines de MmLarE, avec indication des cystéines impliquées dans la liaison du cluster. (B) Vue d'ensemble de la structure d'un monomère de apo-MmLarE (à gauche) et de holo-MmLarE (à droite) superposés via le domaine N-ter, avec un zoom sur la liaison du cluster par les trois cystéines conservées. Les deux structures sont. La cystéine 174 de l'apo-MmLarE forme un pont disulfure intermoléculaire avec la cystéine 96 d'une autre molécule. Le domaine N-ter est coloré en gris, le C-ter en bleu, et la boucle les reliant est en rouge. (C) Les valeurs des facteurs B des deux structures sont présentées le long de la séquence de la protéine.**



## Projet 2 : Étude de la sulfurtransférase LarE - Déroulement

Une analyse a posteriori de la préparation de MmLarE par RP-HPLC, en utilisant comme standards l'AMP ou l'ATP, a confirmé la présence d'AMP co-purifié dans l'échantillon, avec un ratio de 12,5 % mole d'AMP par mole de protéine (Article 2, Figure S7A). De façon similaire, une structure cristallographique de l'enzyme de thiolation de l'ARNt TtuA co-purifiée avec une molécule d'AMP été rapportée (Cf. Introduction IV.). Cette structure provenait de cristaux maclés pour lesquels deux réseaux de taches de diffraction ont pu être séparés, correspondant à TtuA avec un cluster [4Fe-4S] ou TtuA/AMP avec un cluster [2Fe-2S].

Dans les six autres molécules de l'unité asymétrique de la structure de holo-MmLarE, une densité électronique proche du quatrième atome de fer, non lié à la protéine, correspondant à la liaison d'un petit ligand exogène, est également observée (Article 2, Figure 4C). Étant donné que la solution de cristallisation contient 4.1 M de NaCl, cette densité a été attribuée à un ion chlorure. Par conséquent, un résidu chargé négativement se lie systématiquement au quatrième atome de fer du cluster dans toutes les molécules de la structure de holo-MmLarE, que ce soit le groupement phosphate de l'AMP ou un ion chlorure, compensant ainsi la charge positive du cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup>.

Enfin, les structures de MmLarE obtenues ont été comparées aux structures de LpLarE disponibles dans la PDB mentionnées précédemment au niveau du repliement global de la protéine (Article 2, Figure 6A), de la surface électrostatique (Article 2, Figure 6C), des résidus conservés (Article 2, Figure 6D), du site de liaison du nucléotide (Article 2, Figure S10), ainsi que de la disposition du site actif (Article 2, Figure 6B). Par ailleurs, l'ensemble des structures de MmLarE et de LpLarE ont servi de base pour modéliser les principaux intermédiaires catalytiques identifiés pour les deux enzymes (Article 2, "Material and Methods"). Cette démarche complète ainsi la caractérisation biochimique précédente de TmLarE en apportant une dimension structurale au mécanisme catalytique proposé pour ce type de LarE liant un cluster [Fe-S] (Article 2, Figure 8A).

### **Contribution personnelle au projet**

Ayant initié ma thèse avec ce nouveau projet, ma contribution a commencé par la mise en place et la réalisation des tests d'expression de la protéine recombinante. J'ai également été responsable de sa purification et de la reconstitution du cluster et j'ai préparé les échantillons de protéines reconstitués au <sup>57</sup>Fe nécessaires à la caractérisation Mössbauer du cluster. J'ai mené

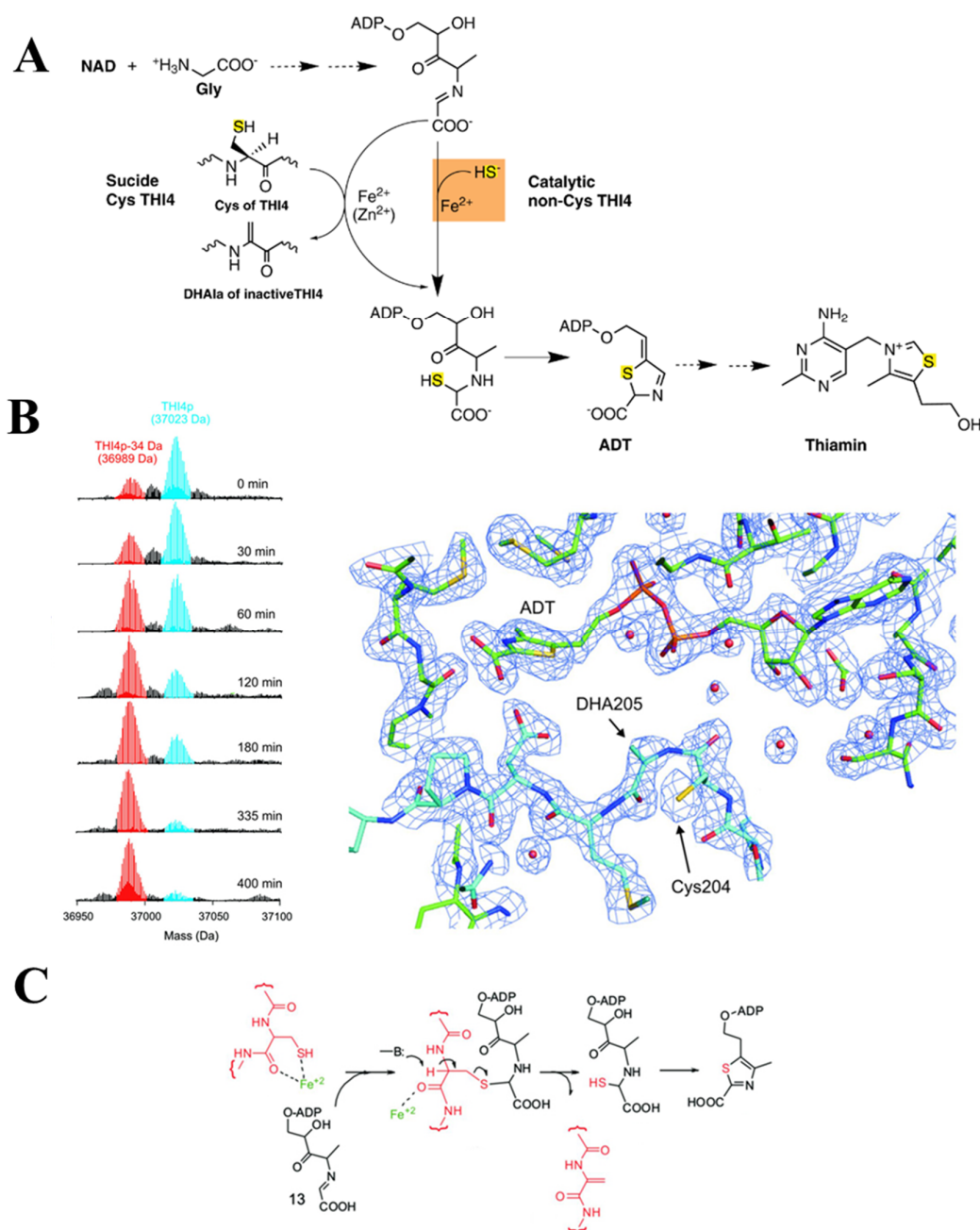
## Projet 2 : Étude de la sulfurtransférase LarE - Déroulement

le criblage des conditions de cristallisation pour apo-LarE et holo-LarE, ainsi que leurs optimisations. J'ai appris à pêcher les cristaux en boîte à gant sous la direction du Dr. L. Pecqueur, ingénieur de recherche au laboratoire, qui m'a également accompagné à la plupart des sessions synchrotrons. Au cours de ce projet, j'ai pu me former aux différentes étapes de la détermination d'une structure cristallographique de protéine, allant du traitement des données de diffraction initiales à la déposition sur la PDB. Pour holoLarE, le Dr. Pecqueur m'a aidé pour le phasage SAD de la structure et pour la construction du premier modèle. J'ai pris en charge l'affinement et la déposition de l'une des deux structures sur la PDB (Article 2, Tableau 1 ; code 8CP4), tandis que le Dr. Pecqueur s'est chargé de l'autre (Article 2, Tableau 1; code 8CNZ). Je me suis également occupé de la résolution de la structure de Apo-LarE, son affinement et sa déposition dans la PDB (Article 2, Tableau 1 ; code 8CP3). De plus, j'ai modélisé les différents intermédiaires catalytiques de MmLarE et de LpLarE et produit les Ligplots associés (Article 2, Figures S9-11). J'ai aussi effectué l'identification et la quantification du nucléotide co-purifié de LarE par RP-HPLC, ainsi que les mesures de DLS. Les autres expériences, telles que le SEC-MALS, la MS et la spectroscopie Mössbauer, ont été effectuées par des collaborateurs. L'ensemble des méthodes utilisées et des résultats obtenus au cours de ce projet sont détaillés dans l'article 2.

## IV. Discussion

Dans le cadre de l'étude des enzymes LarE, la caractérisation de MmLarE, qui appartient à une nouvelle classe de protéines LarE utilisant un cluster [4Fe-4S] catalytique, complète celle de LpLarE, représentant la classe de LarE ayant recours à une cystéine sacrificielle [Fellner, 2016 ; Fellner, 2017]. Une analyse phylogénétique avait révélé que la majorité des protéines LarE présentaient le motif conservé CXXC+C, typique de la classe à centres [Fe-S] [Chatterjee, 2022] et il était surprenant qu'il existe deux mécanismes distincts de transfert de soufre par les protéines LarE pour la biosynthèse du cofacteur P2TMN. Cette situation présente un parallèle avec deux enzymes de thiolation présentées dans la partie 4 de l'introduction, la thiazole synthase (THI4p) et la 4-thiouridine synthetase (TtuI), qui illustrent la situation dans laquelle différentes protéines orthologues peuvent présenter des mécanismes catalytiques distincts.

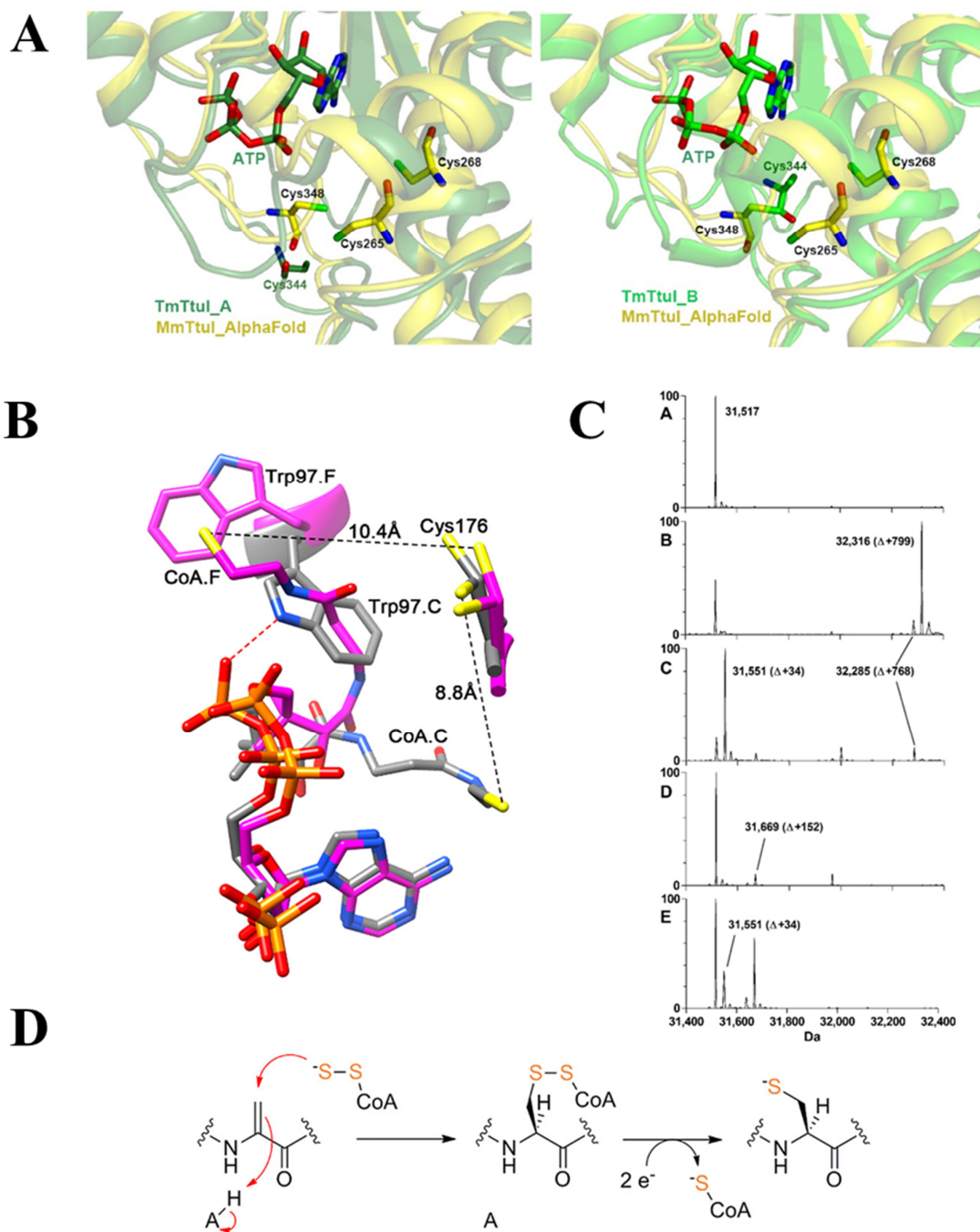
Dans le premier cas, la THI4p catalyse l'insertion de soufre lors de la biosynthèse du thiazole de thiamine en utilisant différents mécanismes catalytiques selon les organismes (**Figure 66**) [Begley, 2012 ; Eser, 2016 ; Joshi, 2021]. Le mécanisme réactionnel de THI4p de *S. cerevisiae* (ScTHI4p) est comparable à celui de LpLarE. En effet, cette enzyme, dépendante du Fe (II), catalyse le transfert du soufre provenant du thiol d'un résidu cystéine conservé de son site actif, conduisant à la formation de déshydroalanine et l'inactivation de la protéine après un seul cycle catalytique (**Figures 66 et 58H**) [Chatterjee, 2011]. Le fait que l'inactivation ait lieu même en présence d'un excès de sulfure et qu'aucun mécanisme de régénération de la cystéine n'ait été identifié, a conduit à qualifier cette enzyme de "sacrificielle" [Chatterjee, 2011 ; Eser, 2016]. La THI4p de l'archée *M. jannaschii* (MjTHI4) possède un résidu histidine à la place de la cystéine du site actif de ScThi4p et peut réaliser plusieurs cycles catalytiques en utilisant du sulfure libre comme source de soufre [Eser, 2016]. Ce sulfure exogène pourrait provenir de l'environnement naturel de cette archée qui contient des concentrations de sulfure de l'ordre du millimolaire [Liu, 2012]. Ainsi, à l'instar de LarE, la thiamine thiazole illustre une enzyme dont un orthologue est sacrificiel avec un seul cycle catalytique, tandis que d'autres orthologues ont une activité catalytique, effectuant plusieurs cycles de catalyse.



**Figure 66 : (A) Biosynthèse du précurseur thiazole de la thiamine par les enzymes THI4, utilisant un mécanisme sacrificiel chez certaines levures et plantes (ScTHI4p), et non-sacrificiel chez certaines archées (MjTHI4p). D'après [Joshi, 2021]. (B) À gauche : Analyse MS de ScTHI4p au cours de la réaction enzymatique, montrant la conversion progressive de la protéine native en une forme d'une masse inférieure de 34 Da, correspondant à la perte du groupement thiol de la cystéine catalytique. À droite : Site actif de ScTHI4p avec le produit lié ; carte de densité électronique 2Fo-Fc à 3  $\sigma$ . Une distance de 5,3 Å sépare l'atome de soufre du produit et l'atome C $\beta$  du résidu de déhydroalanine. D'après [Chatterjee, 2011]. (C) Mécanisme catalytique sacrificiel proposé pour ScTHI4p. Le transfert du groupe thiol du résidu cystéine (indiqué en rouge) vers le substrat (indiqué en noir) serait facilité par un ion Fe $^{2+}$  et un autre résidu de l'enzyme fonctionnant comme une base. D'après [Chatterjee, 2011].**

Le deuxième exemple concerne la U8-ARNt sulfurtransférase TtuI, qui catalyse la thiolation ATP-dépendante de l'uridine en position 8 de l'ARNt. Plusieurs classes distinctes de protéines TtuI ont été identifiées, possédant toutes deux un domaine pyrophosphatase avec une PP-loop et une cystéine conservée [He, 2022]. La première classe, représentée par *E. coli* TtuI (EcTtuI), se distingue par un domaine rhodanèse additionnel (Cf. Introduction IV) qui contient une seconde cystéine pouvant accepter un atome de soufre, provenant de la cystéine en solution et transporté par IscS sous forme de persulfure, pour former un persulfure [Kambampati 2000, He 2022]. L'insertion du soufre de ce persulfure dans l'ARNt par TtuI est suivie par la coupure du pont disulfure formé entre la protéine et l'ARNt grâce à la cystéine conservée du domaine central [Mueller, 2001 ; He, 2022]. La deuxième classe de protéines TtuI regroupe des orthologues d'archées qui ne possèdent pas de domaine rhodanèse mais qui possèdent un motif CXXC+C conservé (**Figures 58G et 67A**). Les caractérisations biochimiques de TtuI provenant des archées *P. furiosus* (PfTtuI) et *M. maripaludis* (MmTtuI) ont montré que ces enzymes lient un cluster [4Fe-4S] catalytique et agissent suivant un mécanisme réactionnel similaire à celui de MmLarE ou TtuA (Cf. Introduction IV). Curieusement, certaines protéines TtuI orthologues n'appartiennent à aucune des deux premières classes car elles ne possèdent qu'une unique cystéine conservée dans leur site actif et pas de motif CXXC+C (**Figure 67A**). Les études biochimiques et structurales sur TtuI de *T. maritima* et *B. anthraxis* ont montré le rôle crucial de cette cystéine pour l'activité enzymatique mais aucun autre résidu n'a été identifié comme étant impliqué dans la catalyse, ce qui fait que le mécanisme réactionnel de ce type de protéines TtuI demeure énigmatique [Rajakovich, 2012 ; Neumann, 2014 ; Waterman, 2006]. Il a été proposé qu'une deuxième cystéine catalytique, appartenant à un domaine rhodanèse en *trans*, intervienne dans la catalyse mais un mécanisme sacrificiel, analogue à celui proposé pour LpLarE, pourrait également être envisagé.

De manière générale, les enzymes dites sacrificielles telles que LpLarE ou THI4p, qui réalisent un seul cycle catalytique, soulèvent des interrogations quant à l'intérêt physiologique d'un tel mécanisme, notamment vis-à-vis du coût énergétique pour la cellule qui doit synthétiser la protéine entière pour réaliser une seule réaction. Concernant ScTHI4p, certains auteurs ont suggéré que la forme inactive de l'enzyme pourrait avoir une fonction particulière chez la levure, fonction qui ne serait pas nécessaire chez les procaryotes ou les archées dont l'orthologue de THI4p est catalytique [Eser, 2016]. Ainsi, la biosynthèse de la thiamine thiazole chez la levure pourrait représenter un mécanisme de modification post-traductionnelle qui serait couplée à la production d'un métabolite essentiel [Eser, 2016].



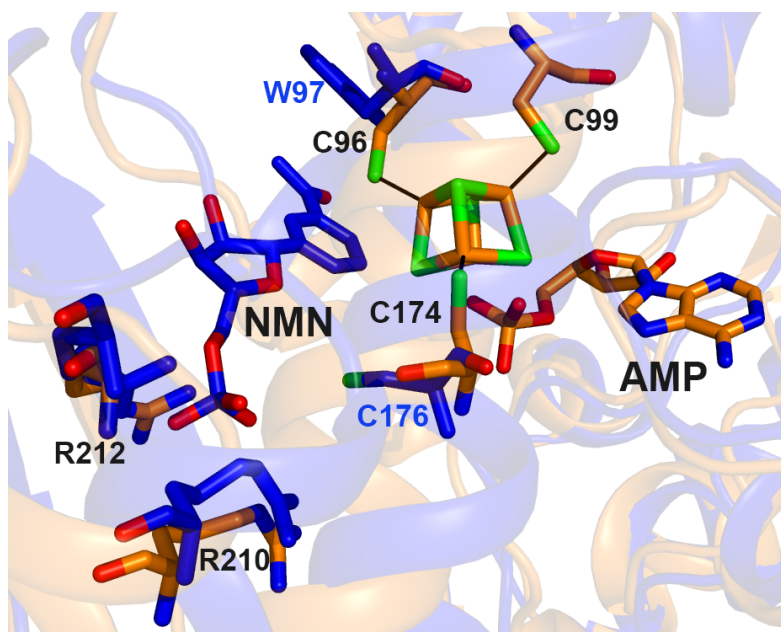
**Figure 67 :** (A) Superposition des sites actifs du modèle AlphaFold de MmTtuI et des deux chaînes de la structure cristalline de TmTtuI ; les cystéines conservées sont représentées en sticks [He, 2022]. (B) Comparaison des deux orientations du CoA dans la structure de LpLarE [Fellner, 2018] (C) Régénération de LpLarE native à partir de LpLarE-Dha : (a) ESI-MS de LpLarEDha. (b) LpLarE-Dha traitée avec du persulfure de CoA, révélant la conversion en disulfure LarE-S-S-CoA. (c) Échantillon du panneau précédent réduit avec du DTT pour générer du LarE natif. (d) LpLarE-Dha traité avec du persulfure de Cys. (e) Échantillon du panneau précédent traité avec du DTT. (D) Proposition de mécanisme de régénération de la forme native de LpLarE à partir de LpLarE-Dha [Fellner, 2018].

Dans le cas de LpLarE, l'interrogation quant à l'utilisation d'un mécanisme sacrificiel est d'autant plus pertinente que l'enzyme est censée catalyser deux insertions successives de soufre sur le substrat pour achever complètement la réaction [Fellner, 2017]. Les auteurs ont tenté de régénérer la forme active de l'enzyme (contenant Cys176) à partir de l'enzyme inactive contenant la déhydroalanine (LarE-Dha) en l'incubant avec différents donneurs potentiels de soufre, comme le sulfure, la cystéine, la cystéine et la cystéine désulfurase, le 3-mercaptopyruvate, ou avec divers cofacteurs tels que le glutathion et le CoA [Fellner, 2018]. Parmi toutes les conditions testées, la conversion de LarE-Dha en LpLarE active n'a été observée qu'en présence de coenzyme A (CoA) persulfuré [Fellner, 2018]. L'analyse par LC-MS du produit formé après incubation de LarE-Dha avec du CoA-SH indique une augmentation de masse de l'enzyme de 799 Da (**Figure 67C**) correspondant à la formation d'un intermédiaire LarE-S-S-CoA via la formation d'un pont disulfure entre les deux molécules (**Figure 67D**). L'ajout d'un réducteur au mélange, tel que le DTT ou la cystéine, élimine cet intermédiaire et donne lieu à un pic correspondant à LpLarE dans sa forme native (31551 Da) (**Figure 67D**). Ces observations sont en accord avec des expériences antérieures qui avaient montré par LC-MS que le CoA non persulfuré pouvait former un pont disulfure avec la cystéine catalytique de LpLarE [Desguin, 2016]. De plus, il avait été montré que le CoA n'était pas indispensable à l'activité enzymatique de LpLarE et que l'intermédiaire CoA-protéine disparaissait au bénéfice de la forme LarE-Dha lors d'expériences d'activation *in vitro* de LarA [Desguin, 2016]. Afin de comprendre l'interaction entre LpLarE et CoA, la structure de LpLarE co-cristallisée avec du CoA a été déterminée, montrant que chaque monomère de l'hexamère de LpLarE est lié à une molécule de CoA [Fellner, 2018]. Cette liaison s'effectue au niveau de l'adénine et du ribose de CoA de la même façon que la fixation de l'ATP mais aucun pont disulfure entre le CoA et la cystéine catalytique de LpLarE n'a été observé, peut-être en raison d'un dommage de radiation lors de la collecte des données [Fellner, 2018]. Le CoA présente deux orientations différentes, avec des distances assez grandes, de 8,8 et 10,4 Å, respectivement, entre l'atome de soufre de la cystéine catalytique et celui du CoA (**Figure 67B**) [Fellner, 2018]. Ces structures ne semblent donc pas représenter une conformation active de CoA liée à LpLarE. En somme, bien que la régénération de la forme native de LpLarE à partir de la forme LarE-Dha inactive par un persulfure de CoA ait été démontrée *in vitro* [Fellner, 2018], il n'est pas clair que ce mécanisme existe *in vivo*.

La superposition des structures de LpLarE et holo-MmLarE permet d'exclure la possibilité que LpLarE lie un centre [Fe-S] (**Figure 68**) (Article 2, Figure 6). En effet, bien que la cystéine-

176 sacrificielle soit superposée avec Cys174, ligand du cluster de MmLarE, il n'y a pas d'autres résidus, correspondant aux deux autres cystéines, Cys96 et Cys99 de MmLarE, susceptibles de lier le cluster dans LpLarE. De plus, un mécanisme faisant intervenir la formation d'un persulfure sur la cystéine-176 semble peu probable à cause de l'absence d'un résidu proche capable de réduire ce disulfure pour permettre l'insertion du soufre dans le substrat (cf. Introduction IV).

Il convient de souligner que, contrairement au cas de THI4P [Eser, 2016], aucune source de soufre n'était introduite lors des différents tests *in vitro* d'activité enzymatique de LpLarE [Fellner, 2016 ; Fellner, 2017]. Cela soulève la question de savoir si le sacrifice du groupe thiol de la cystéine catalytique pourrait être un artefact résultant de l'absence d'un donneur de soufre approprié dans les conditions expérimentales. Il serait donc pertinent d'évaluer l'activité de LpLarE en présence d'une source de soufre afin de déterminer le nombre de cycles catalytiques possibles et de vérifier si l'intermédiaire LpLarE-Dha est systématiquement généré.



**Figure 68 :** Comparaison des sites actifs de holo-MmLarE et LpLarE par superposition des domaines N-ter de la molécule A de holo-MmLarE (en orange) et de LpLarE (en bleu) (rmsd moyen de la superposition de 1,2 Å sur 616 C $\alpha$ ). Les molécules de NMN (issues du cristal de LpLarE) et d'AMP (issues du cristal de MmLarE) sont représentées en bâtonnets et colorées respectivement en bleu et en orange.



## **V.Article 2**

Les trois structures cristallographiques de MmLarE associées à cet article ont été déposées dans la PDB.

# Structure-based insights into the mechanism of [4Fe-4S]-dependent sulfur insertase LarE

Paolo Zecchin<sup>1</sup> | Ludovic Pecqueur<sup>1</sup> | Jonathan Oltmanns<sup>2</sup> |  
 Christophe Velours<sup>3</sup> | Volker Schünemann<sup>2</sup> | Marc Fontecave<sup>1</sup> |  
 Béatrice Golinelli-Pimpaneau<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, CNRS UMR 8829, Sorbonne Université, Paris cedex 05, France

<sup>2</sup>Universität of Kaiserslautern-Landau, Department of Physics, Kaiserslautern, Germany

<sup>3</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette cedex, France

## Correspondence

Béatrice Golinelli-Pimpaneau, Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, UMR 8829 CNRS, Sorbonne Université, 11 Place Marcelin Berthelot, 75231 Paris cedex 05, France.  
 Email: [beatrice.golinelli@college-de-france.fr](mailto:beatrice.golinelli@college-de-france.fr)

## Present address

Christophe Velours, Fundamental Microbiology and Pathogenicity Laboratory, UMR 5234 CNRS-University of Bordeaux, SFR TransBioMed, Bordeaux, France.

## Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: "LABEX DYNAMO" ANR-11-LABX-0011

**Review Editor:** Lynn Kamerlin

## Abstract

Several essential cellular metabolites, such as enzyme cofactors, contain sulfur atoms and their biosynthesis requires specific thiolation enzymes. LarE is an ATP-dependent sulfur insertase, which catalyzes the sequential conversion of the two carboxylate groups of the precursor of the lactate racemase cofactor into thiocarboxylates. Two types of LarE enzymes are known, one that uses a catalytic cysteine as a sacrificial sulfur donor, and the other one that uses a [4Fe-4S] cluster as a cofactor. Only the crystal structure of LarE from *Lactobacillus plantarum* (LpLarE) from the first class has been solved. We report here the crystal structure of LarE from *Methanococcus maripaludis* (MmLarE), belonging to the second class, in the cluster-free (apo-) and cluster-bound (holo-) forms. The structure of holo-MmLarE shows that the [4Fe-4S] cluster is chelated by three cysteines only, leaving an open coordination site on one Fe atom. Moreover, the fourth nonprotein-bonded iron atom was able to bind an anionic ligand such as a phosphate group or a chloride ion. Together with the spectroscopic analysis of holo-MmLarE and the previously reported biochemical investigations of holo-LarE from *Thermotoga maritima*, these crystal structures support the hypothesis of a reaction mechanism, in which the [4Fe-4S] cluster binds a hydrogenosulfide ligand in place of the chloride anion, thus generating a [4Fe-5S] intermediate, and transfers it to the substrate, as in the case of [4Fe-4S]-dependent tRNA thiolation enzymes.

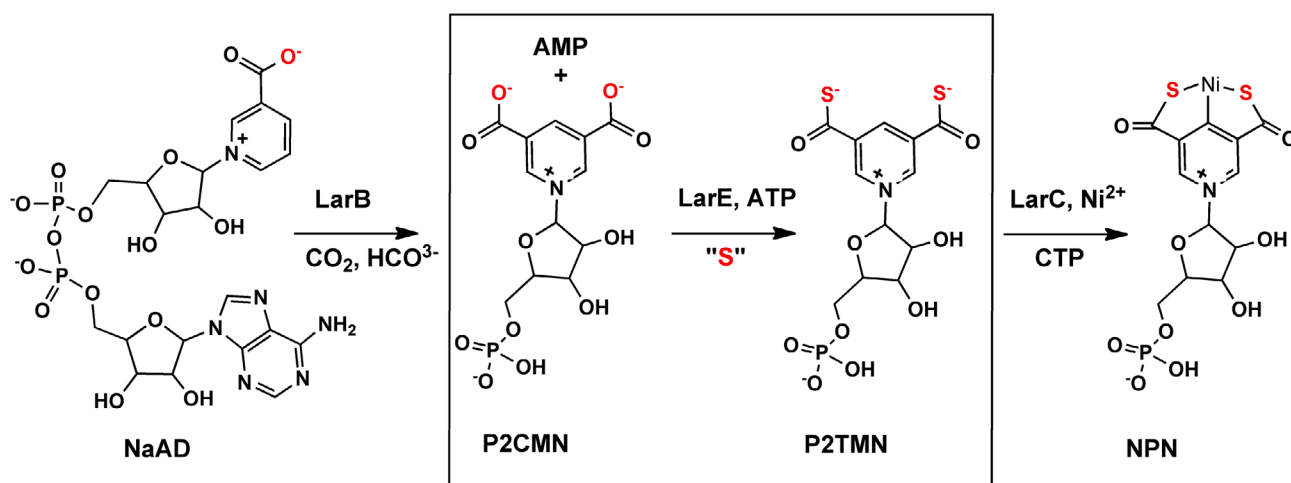
## KEYWORDS

[4Fe-5S], AlphaFold, catalytic mechanism, crystal structure, iron sulfur cluster [4Fe-4S], LarE, sulfur insertase

## 1 | INTRODUCTION

Lactate racemase (LarA) interconverts the D- and L-isomers of lactic acid, a central metabolite in many organisms. Lactic acid is involved in the energy metabolism of many prokaryotes, as a product of sugar fermentation or as a carbon and electron source to sustain growth.

Lactate racemization is a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machineries in bacteria such as *Lactobacillus plantarum* (Goffin et al., 2005). The LarA enzyme depends on an organometallic cofactor named nickel-pincer nucleotide (NPN; Figure 1), which is bound to conserved histidines through the Ni center (Desguin et al., 2014). The synthesis of NPN requires three



**FIGURE 1** Biosynthesis of the nickel-pincer nucleotide (NPN) cofactor of lactate racemase. The biosynthesis of the LarA cofactor, NPN, involves three enzymes: LarB, LarE and LarC. LarB is a carboxylase/hydrolase of nicotinic acid adenine dinucleotide (NaAD), which forms P2CMN (pyrimidinium-3,5-biscarboxylic acid mononucleotide). LarE catalyzes the ATP-dependent sulfur insertion into the two carboxylate groups of P2CMN to form P2TMN (pyridinium-3,5-bisthiocarboxylic acid mononucleotide). LarC is a CTP-dependent enzyme that inserts nickel in to P2TMN to form NPN.

enzymes (Figure 1). LarB converts nicotinic acid dinucleotide (NaAD) into pyrimidinium-3,5-biscarboxylic acid mononucleotide (P2CMN) and adenosine monophosphate (AMP) by carboxylating the C5 atom of the pyridinium ring using bicarbonate. Then, adenosine triphosphate (ATP)-dependent sulfur insertase LarE sequentially converts the two carboxylate groups of P2CMN into thiocarboxylates to yield first pyridinium-3-carboxy-5-thiocarboxylic acid mononucleotide (PCTMN) and then pyridinium-3,5-bisthiocarboxylic acid mononucleotide (P2TMN). Finally, cytidine triphosphate (CTP)-dependent LarC inserts nickel into P2TMN to yield NPN.

LarE enzymes belong to the N-type pyrophosphate (PP)-loop proteins superfamily and share a common pyrophosphatase (PPase) catalytic domain (Fellner, Hausinger, & Hu, 2018; Figure S1). Two distinct classes of LarE proteins, operating with different catalytic mechanisms, have been described. In the first class, exemplified by LarE from *L. plantarum* (LpLarE), one conserved cysteine, Cys176, sacrifices its sulfur atom to give it for insertion into P2CMN, being thus converted into dehydroalanine (Fellner et al., 2017). In contrast, the major class, exemplified by LarE from *Thermotoga maritima* (TmLarE), contains a CXXC + C motif. It was proposed that the cysteines of this motif bind a [4Fe-4S] cluster that is essential for catalysis, based on activity tests of TmLarE, the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectrum of the reduced wild-type enzyme and the characterization of the triple cysteine to alanine mutant, which was shown to contain almost no cluster and was nearly catalytically inactive (Chatterjee et al., 2022). Moreover, it was shown that the catalytic activity of holo-TmLarE was increased

four-fold by incubation with L-cysteine and cysteine desulfurase IscS, an enzyme system that liberates sulfur from L-cysteine in the form of a IscS-bound persulfide. Finally, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis indicated that the sulfane atom of the IscS-bound persulfide is lost upon incubation with holo-TmLarE. These results suggested that the sulfane atom can be transferred to the cluster of TmLarE to form a [4Fe-5S] species, catalytically competent to give a sulfur atom to the PCMN substrate (Chatterjee et al., 2022).

Whereas the crystal structure of sacrificial LpLarE has been solved (Fellner et al., 2017), the structure of [4Fe-4S]-dependent LarE proteins has not been determined experimentally. In order to decipher how two enzymes are able to catalyze the same reaction using two different kinds of catalytic mechanisms, we report here the crystal structure of LarE from *Methanococcus maripaludis* (MmLarE; 28.3% sequence identity with TmLarE), which, like TmLarE, is a [4Fe-4S]-dependent protein. Comparison of the structures of apo-MmLarE (without the cluster) and holo-MmLarE (with bound cluster) suggests that the cluster, in addition to its catalytic function, fulfills a structural role by stabilizing the folding of the two domains of LarE (C-terminal and P2CMN-binding domains) into a catalytically competent conformation. One of the holo-MmLarE structures shows that a chloride ion can serve as a ligand of one Fe atom of the [4Fe-4S cluster], while the three other Fe atoms are coordinated by conserved cysteines. This illustrates the ability of the cluster to bind an exogenous inorganic anion and provides a model for the [4Fe-5S] cluster intermediate proposed as the S atom donor during catalysis.

Based on the various crystal structures of LpLarE and MmLarE, we modeled various catalytic intermediates along the MmLarE- and Lp-LarE-catalyzed sulfur-insertion reaction. These models, together with the comparison of the active site structures of the two types of LarE enzymes, give insights into their distinct catalytic mechanism.

## 2 | RESULTS

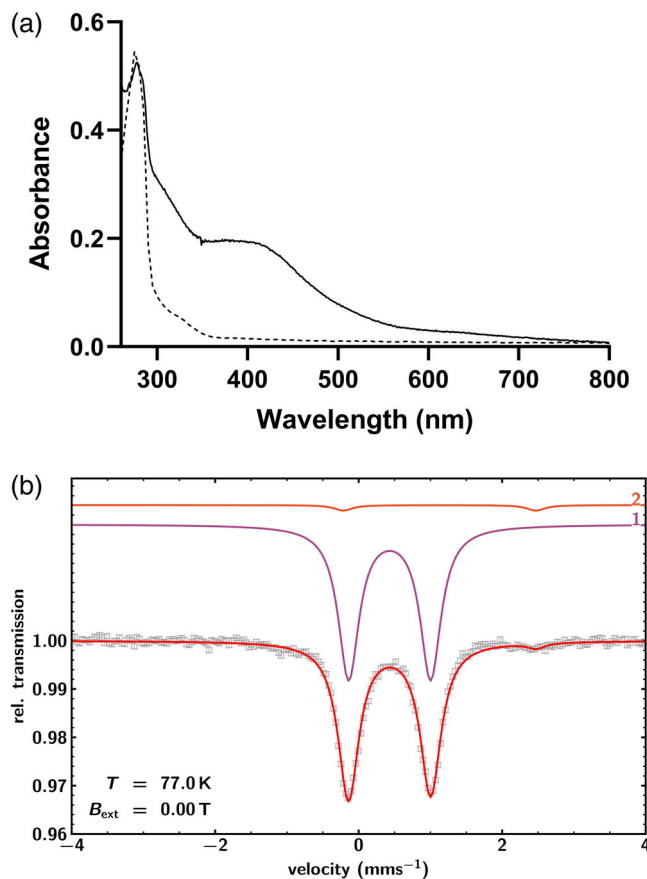
### 2.1 | Purification and characterization of MmLarE

MmLarE was expressed with a cleavable N-terminal 6-histidine tag, then purified under aerobic conditions by nickel affinity chromatography (Figure S2A). The tag was removed using the H3C protease and the protein was further purified by size-exclusion chromatography (Figure S2B,C, first column). The protein purified this way, named “as-purified” MmLarE, appeared colorless and exhibited a UV-visible spectrum with no absorption band at around 410 nm, indicating that the protein is devoid of [Fe-S] clusters (Figure 2A). This result was confirmed by the quantification of Fe using the Fish method, which uses permanganate to release the complexed iron in solution, ascorbic acid to reduce it, and ferrozine and neocuproine to chelate it, the formation of the [Fe<sup>II</sup>] ferrozine complex being quantified by absorption colorimetry (Fish, 1988). The Fe content was  $<0.1 \pm 0.2$  mole Fe per monomer.

### 2.2 | A [4Fe-4S] cluster can be assembled in MmLarE

Cluster reconstitution was carried out, under strict anaerobic conditions, by treating the ‘as-purified’ protein with a 5-molar excess of ferrous iron in the presence of a sulfur source (consisting in L-cysteine and cysteine desulfurase CsdA), and a reductant (dithiothreitol [DTT]). The protein was then purified on a Superdex 200 gel filtration column (Figure S3A), also under anaerobic conditions, leading to a homogenous brownish protein containing a [Fe-S] cluster that was subsequently called holo-MmLarE. Size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering (SEC-MALS) analysis of holo-MmLarE indicated that it was a dimer in solution (measured molar mass of  $58.8 \pm 0.6$  kDa; theoretical molar mass of one monomer: 31.12 kDa; Figure S3B).

Quantification of the iron content in holo-MmLarE gave  $3.1 \pm 0.2$  Fe per monomer. The UV-visible spectrum of purified holo-MmLarE displayed a broad absorption band at around 410 nm that is characteristic for the



**FIGURE 2** Spectroscopic characterization of MmLarE. (a) UV-visible spectrum of 30  $\mu$ M as-purified MmLarE (dotted line) and holo-MmLarE (solid line) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 300 mM NaCl, and 5 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol. (b) Mössbauer spectrum at 77 K and  $B_{\text{ext}} = 0$  T of holo-MmLarE (540  $\mu$ M) in 50 mM TRIS-HCl pH 8.5, 180 mM NaCl, 5 mM DTT, after reconstitution of the cluster with <sup>57</sup>Fe. The red solid line is a simulation with two components (1 and 2) and the parameters given in Table S1.

presence of a [4Fe-4S] cluster (Figure 2A). Since Mössbauer spectroscopy using the <sup>57</sup>Fe nucleus (Gütlich et al., 2011) is an excellent tool to identify and explore iron-sulfur clusters (Beinert et al., 1997; Ueda et al., 2021), we prepared samples with isotopically enriched <sup>57</sup>Fe. The Mössbauer spectrum of holo-MmLarE obtained at  $T = 77$  K showed a major component (97%), exhibiting a doublet with an isomer shift of  $\delta = 0.43$  mm s<sup>-1</sup> and a quadrupole splitting of  $\Delta E_Q = 1.14$  mm s<sup>-1</sup> (Figure 2B and Table S1). These parameters are typical for diamagnetic [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters (Schünemann, 2021). The observed  $\delta = 0.43$  mm s<sup>-1</sup> lies in between the isomer shift values of tetrahedral sulfur-coordinated Fe(II) and Fe(III) and is characteristic for mixed valence Fe(II)Fe(III) pairs with a delocalized electron occurring twice in diamagnetic [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters. The minor component (3%), with  $\delta = 1.13$  mm s<sup>-1</sup> and  $\Delta E_Q = 2.69$  mm s<sup>-1</sup> is characteristic of high spin Fe<sup>2+</sup> (Schünemann et al., 1999). The diamagnetic ground state

of the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster was confirmed by a Mössbauer spectrum recorded at  $T = 4.2$  K and an applied magnetic field  $B_{\text{ext}} = 5.0$  T. This spectrum shows magnetic splitting, which is due to the external field only, and could be simulated, assuming a diamagnetic ground state of the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster, using the spin Hamiltonian formalism (Gütlich et al., 2011; Pandelia et al., 2015; Figure S4 and Table S1). Since no further components could be identified, our Mössbauer spectroscopy analysis confirmed the absence of other clusters such as  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  and  $[3\text{Fe-4S}]^+$  clusters (Pandelia et al., 2015).

### 2.3 | Determination of the crystal structure of holo-MmLarE using single anomalous diffraction-phasing

We initially obtained crystals of holo-MmLarE diffracting at 3.2 Å resolution, which belonged to space group C222<sub>1</sub> (Crystal 1, Table 1). Since the AlphaFold software (Jumper et al., 2021), which accurately predicts the three-dimensional structure of proteins based on their sequence only, was not released at that time, we first attempted to phase the data by molecular replacement with PHASER (McCoy et al., 2007). LpLarE was used as a model (PDB code 5UDQ; 26.8% sequence identity with MmLarE; see sequence alignment in Figure S1), after editing the coordinates with SCULPTOR (Bunkóczi & Read, 2011). However, the search for the full model or two domains failed. As MmLarE contains a  $[4\text{Fe-4S}]$  cluster, the structure was solved by single anomalous diffraction (SAD) using data collected at the Fe edge (7.125 keV, Table 1). The experimental map contained an anomalous signal up to 4.5 Å resolution, which allowed to build a model with seven copies in the asymmetric unit after a laborious sequence of steps (see Sections 4.2). This first holo-MmLarE crystal structure was refined at 3.6 Å resolution.

The asymmetric unit is composed of seven monomers (Figure 3A), among which six form dimers (Figure 3B). The seventh monomer also forms a dimer with another monomer from the neighboring asymmetric unit. This is consistent with the observation that MmLarE is a homodimer in solution, as shown by SEC-MALS analysis (Figure S3B). The crystal packing involves heptamers of dimers (Figure S5), the interface of the most tightly assembled dimer being  $907 \pm 14$  Å<sup>2</sup> and the interface of the others being  $456 \pm 42$  and  $231 \pm 19$  Å<sup>2</sup>, as calculated with PISA (Krissinel, 2010). Thus, the analysis of the crystallographic contacts supports that the enzyme is functional as a dimer, in agreement with the analysis of the oligomeric state in solution. The seven chains of the

holo-MmLarE crystal structure are very close to each other (Figure 3C and Table S2).

One monomer, composed of 13 α-helices and 7 β-strands, can be decomposed into two domains, the N-terminal catalytic domain (residues M1-L164) and the C-terminal domain (residues M175-K258; Figure 3B). Like in LpLarE, the N-terminal domain contains the characteristic PP-loop motif for ATP binding (SGGxDS, Fellner et al., 2017; see Figure S1). It also contains two of the three cysteines involved in coordination of the iron-sulfur cluster of MmLarE (see below). Dimerization occurs through the C-terminal end (residues M214-K258; Figure 3B,D), which includes an antiparallel β-sheet between strand β7 (residues V251-L255) from each chain, as well as numerous van der Waals interactions and a few electrostatic interactions. A linker (residues K165-C174) connects the two domains and contains the last cysteine used in iron-sulfur cluster coordination (see below). Thus, the  $[4\text{Fe-4S}]$  cluster is bound at the interface between the N- and C-terminal domains (Figure 3B,C).

### 2.4 | The AlphaFold2 model of MmLarE exhibits a globular architecture ready to bind the cluster

During the course of this study, the AlphaFold software was released (Jumper et al., 2021). The superposition of each chain of the holo-MmLarE crystal structure with the AlphaFold2 model (AF-Q6LXV7-F1-model\_v4) using the program ProFit3 (<http://www.bioinf.org.uk/software/profit>) gives an average root mean square deviation (RMSD) of 0.57–0.87 Å for 248 Cα atoms (Figure S6 and Table S2). This indicates that the AlphaFold2 model is very close to the experimentally determined crystal structure of the holo-enzyme. Interestingly, the prediction by AlphaFold2, which did not contain any information about the cluster, gives a model of the MmLarE monomer with a globular fold, in which the three cysteines expected to coordinate the cluster adopt a geometry compatible with cluster binding. This result was also reported for several other [Fe-S]-binding proteins (Golinelli-Pimpaneau, 2022).

In addition, the AlphaFold2 model of the MmLarE dimer was calculated, and was predicted with a high confidence (Predicted Local-Distance Difference Test of 91.1 and predicted Template Modeling score of 0.82; Figure S6C). Again, the model of the dimer is very close to the structure obtained from the experimental crystallographic data of the holo-enzyme. However, after superposition of one monomer from the AlphaFold2 model and the crystal structure (RMSD of 0.989 Å over 1765 Cα

TABLE 1 Data collection and refinement statistics.

	Holo-MmLarE (crystal 1)		Holo-MmLarE (crystal 2)	Apo-MmLarE
PDB code	8CNZ		8CP4	8CP3
Data collection				
Photon energy (keV)	7.125	12.670	12.670	12.670
Space group	C 2 2 2 <sub>1</sub>		C 2 2 2 <sub>1</sub>	R 3 2: H
Cell dimensions				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	187.4 209.6 195.7	187.5 209.2 195.8	186.2 212.7 196.7	144.8 144.8 193.6
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90 90 90		90 90 90	90 90 120
Resolution (Å)	139.7–3.16 (3.45–3.16)	113.7–3.14 (3.48–3.14)	46.78–3.19 (3.39–3.19)	48.18–2.35 (2.49–2.35)
<i>R</i> <sub>sym</sub> or <i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>a</sup>	0.35 (2.64)	0.170 (1.17)	0.152 (2.34)	0.065 (2.37)
<i>R</i> <sub>meas</sub> <sup>b</sup>	0.36 (2.70)	0.186 (1.27)	0.163 (2.10)	0.067 (2.43)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	7.5 (1.7)	7.0 (1.7)	7.6 (0.77)	25.4 (0.95)
Completeness (%)				
Spherical	70.0 (15.1)	65.7 (12.6)	99.7 (98.2)	99.7 (98.5)
Ellipsoidal	93.7 (59.6)	93.7 (65.8)	—	—
No. unique reflections	867,284	263,306 (14083)	64,718 (6222)	32,562 (5128)
Redundancy	18.7 (20.6)	6.0 (6.4)	7.8 (7.8)	20.7 (19.1)
CC (1/2) <sup>c</sup>	0.99 (0.64)	1.00 (0.61)	1.00 (0.35)	1.00 (0.501)
Refinement				
Resolution (Å)		55.37–3.60	47.87–3.19	45.16–2.35
No. reflections		40,205	64,593	32,558
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>d</sup>		0.253/0.280	0.216/0.252	0.231/0.250
No. atoms				
Protein		14,378	14,441	3716
[4Fe-4S]		56	56	—
AMP		—	23	—
AMP-PNP		—	—	88
Cl		5	11	—
I		4	—	—
SO <sub>4</sub>		—	—	24
Glycerol		—	—	6
$\beta$ -mercaptoethanol		—	—	8
Water		—	4	30
<i>B</i> -factors				
Macromolecule		118.4	114.4	102.7
[4Fe-4S]		84.8	104.5	—
AMP		—	129.3	—
AMP-PNP		—	—	78.0
Cl		82.3	133.2	—
I		90.3	—	—
SO <sub>4</sub>		—	—	121.5
Glycerol		—	—	87.3
$\beta$ -mercaptoethanol		—	—	102.6
Water		—	108.1	83.4

(Continues)



TABLE 1 (Continued)

	Holo-MmLarE (crystal 1)	Holo-MmLarE (crystal 2)	Apo-MmLarE
RMSD			
Bond lengths (Å)	0.007	0.014	0.008
Bond angles (°)	0.92	1.47	1.095
Ramachandran			
Favored (%)	94.5	95.9	98.3
Allowed (%)	4.5	3.8	1.7
Outliers (%)	1.0	0.3	0.0
Molprobit clashscore	5.6	13.7	5.5

Abbreviations: AMP, adenosine monophosphate; AMP-PNP, adenylyl-imidodiphosphate; RMSD, root mean square deviation.

<sup>a</sup>Arndt et al. (1968).

<sup>b</sup>Diederichs and Karplus (1997).

<sup>c</sup>Diederichs and Karplus (2013).

<sup>d</sup>Brünger (1992) and Tickle et al. (1998).

atoms), the orientation of the second monomer relative to the first monomer is different (Figure S6C), showing the flexibility of one monomer relative to the other. The conformation adopted by the two monomers in the crystal was not predicted by *AlphaFold2*.

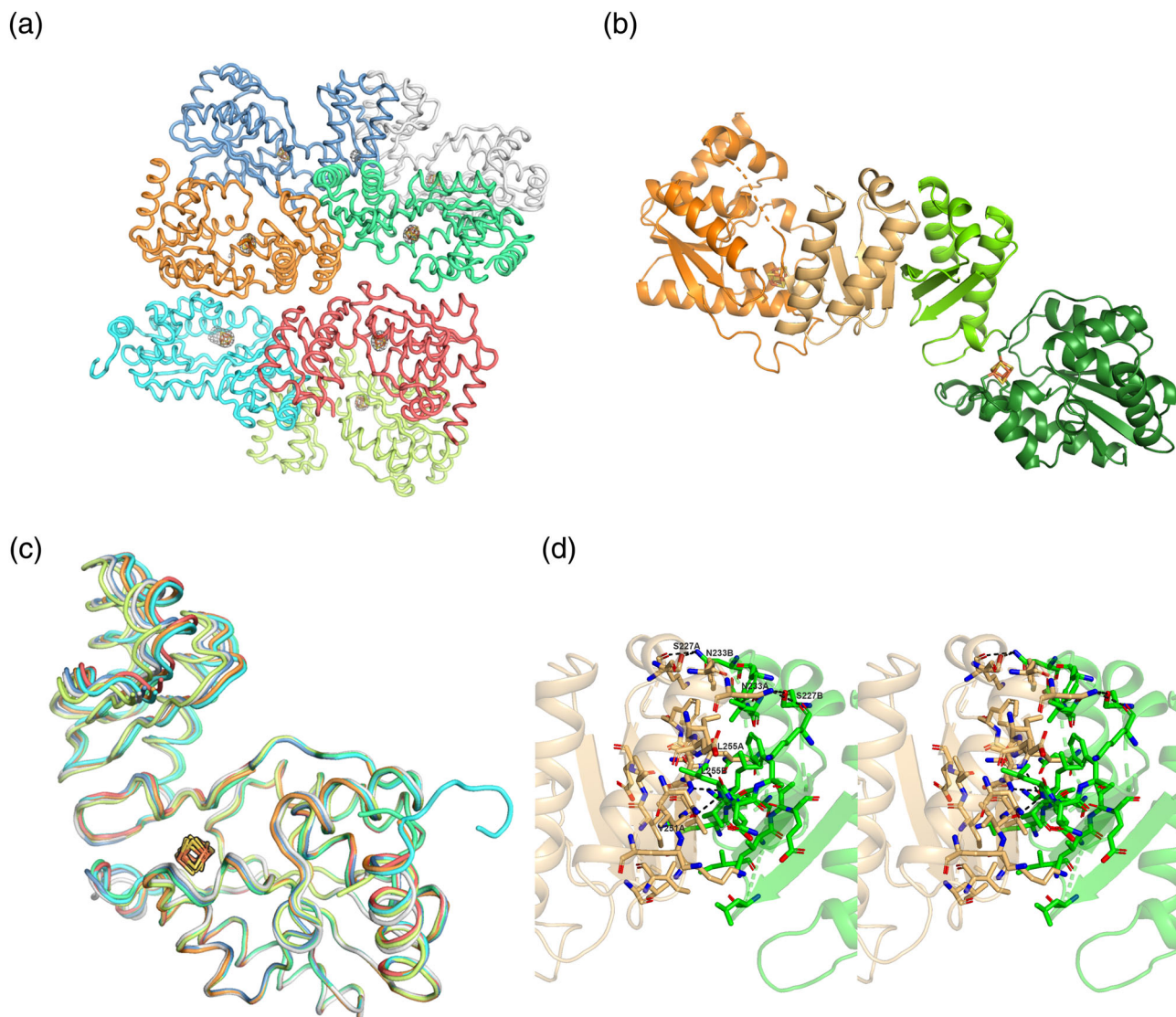
## 2.5 | In holo-MmLarE, the [4Fe-4S] cluster is chelated by three conserved cysteines only and the fourth nonprotein bonded Fe atom is able to bind a negatively charged ligand

A more complete data set of holo-MmLarE was then obtained on another crystal (Crystal 2, Table 1), and the structure was refined at 3.2 Å resolution using the previous model of holo-MmLarE obtained by SAD phasing. In each monomer, one [4Fe-4S] cluster, refined with an occupancy of 0.9–1.0, was bound between the N- and C-terminal domains. It is chelated to the protein by the three conserved cysteines Cys96, Cys99, and Cys174 (Figure 4A). Surprisingly, in one of the molecules in the asymmetric unit (A), an electron density near the fourth iron atom of the cluster revealed the presence of a molecule such as a nucleotide, likely coordinated to it (Figure 4B). To identify this molecule, the “as-purified” protein was precipitated by acidic treatment, neutralized and the supernatant was analyzed by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Figure S7A). By comparison with AMP and ATP standards, the released nucleotide was identified as AMP, one of the products of the reaction, which likely remained bound to the protein throughout the purification procedure. Nucleotide quantification in the “as-purified” protein by HPLC gave a  $12.5\% \pm 1.4\%$  mole per mole ratio of

AMP to “as-purified” MmLarE. AMP fitted the electron density present in molecule A near the [4Fe-4S] cluster, and was refined with an occupancy of 80% (Figure 4B). Two oxygens of the AMP phosphate group lied 2.5 and 2.9 Å away from the nonprotein bonded Fe atom of the cluster, completing its coordination. In the six other molecules in the asymmetric unit, three Fe atoms of the cluster were attached to the protein via the three conserved cysteines, whereas the fourth iron atom was coordinated by a nonprotein, small exogenous ligand, as revealed by the observed electron density adjacent to that Fe atom (Figure 4C). Given that the crystals were obtained in the presence of 4.1 M NaCl, this density was assigned to a chloride ion, 2.2 Å away from that Fe atom, which could be refined with a B-factor in the same range as that of the protein. Therefore, in all molecules of the holo-MmLarE crystal structure, a negatively charged group (phosphate group or chloride ion) binds to the fourth iron atom, complementing the positive charge of the [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster.

## 2.6 | The relative position of the two domains of MmLarE is variable

We also obtained crystals of “as-purified” MmLarE in crystallization conditions different from that of holo-MmLarE, with ammonium sulfate as the precipitant. The crystals belonged to space group H3, contained two molecules in the asymmetric unit, and diffracted to 2.35 Å resolution (Table 1). Surprisingly, the structure could not be solved simply by molecular replacement using the refined model of holo-MmLarE. The C- and N-terminal domains could be positioned only separately. The search with *PHASER* (McCoy et al., 2007) gave only the position of



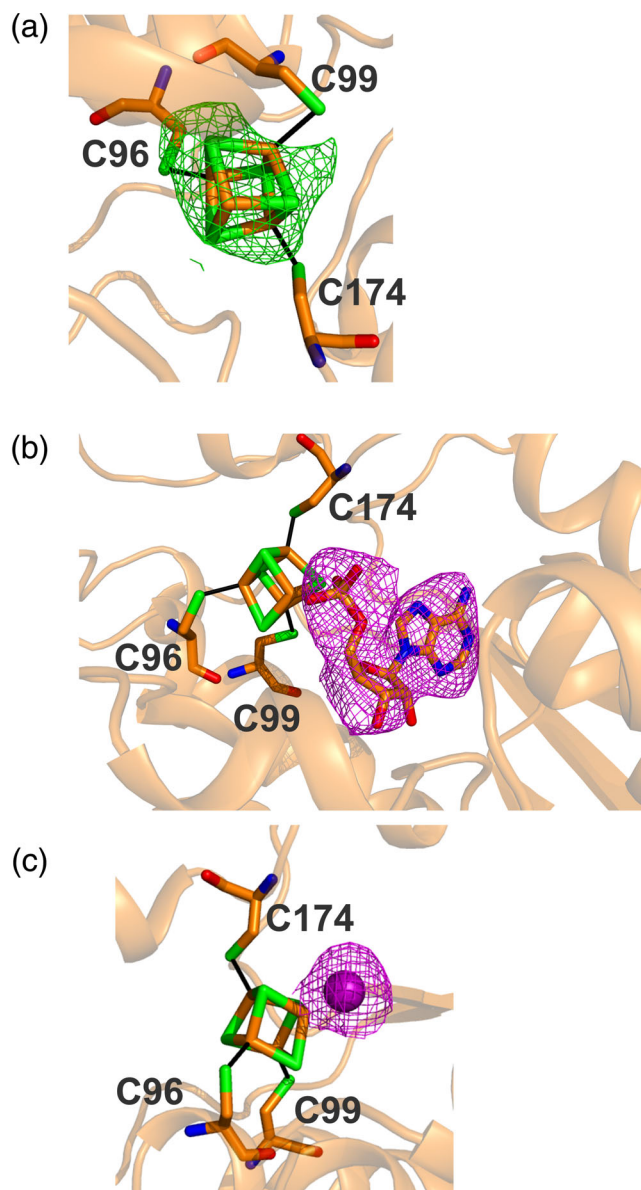
**FIGURE 3** Determination of the crystal structure of holo-MmLarE by SAD phasing. (a) Organization of the seven molecules in the asymmetric unit of holo-MmLarE. The experimental anomalous map contoured at  $5\sigma$  is shown in gray, with the position of the seven super-heavy atoms in the asymmetric unit in stick representation. (b) Dimer of holo-MmLarE. Each monomer is colored in orange and green, with the N- and C-terminal domains shown in dark and light colors, respectively. The [4Fe-4S] cluster is shown as stick representation. (c) Superposition of the  $C\alpha$  trace of the seven monomers of the holo-MmLarE structure solved by SAD. The colors of the monomers are limon (a), tv\_red (b), limegreen (c), cyan (d), orange (e), white (f), skyblue (g). (d) Stereoview of the C-terminal dimerization region of MmLarE. Electrostatic interactions (between Asp254 and Lys250, between Lys224 and Glu237, and between Lys258 and Glu221 from both chains) and H-bonds  $<3.2\text{ \AA}$  are indicated as dashed lines.

the N-terminal domains, which were partially refined. Then, the C-terminal domains were positioned with the Spherically Averaged Phased Translation Function (SAPTF) function in *MOLREP* (Vagin & Isupov, 2001). The structure, which does not contain any iron-sulfur cluster is named apo-MmLarE.

Actually, the orientation of the N- and C-terminal domains relative to each other are completely different in the apo- and holo-structures (Figure 5A–C), which explains why the positioning of the full-length models of holo-MmLarE by molecular replacement failed. Moreover, in

the apo-MmLarE crystal structure, the position of the two domains relative to each other differs in the two molecules in the asymmetric unit (Figure 5A,B). In fact, this particular arrangement, which destroys the dimeric contacts involving the C-terminal end in holo-MmLarE (Figure 5C), is stabilized by a disulfide bond between Cys174 and Cys96 from each monomer linking the two molecules (Figure 5D), despite the presence of a reductant (5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) in the buffer used to purify and store the enzyme. The presence of the disulfide bond was confirmed in solution by nano liquid





**FIGURE 4** Active site structure of holo-MmLarE. (a) The [4Fe-4S] cluster is bound to the three conserved cysteines. An anomalous electron density map at the Fe edge, contoured at  $2\sigma$  and shown in green, is superimposed onto the active site of molecule A of holo-MmLarE. (b) In molecule A, the fourth, nonprotein bonded Fe atom lies 2.1 and 2.2 Å away from two oxygens of the phosphate group of AMP. An electron density map, omitting AMP and contoured at  $2.5\sigma$ , is shown in magenta. (c) In the other molecules in the asymmetric unit, an extra electron density near the fourth, nonprotein bonded Fe atom, was attributed to a chloride ion, located 2.2 Å away from that Fe atom. The electron density map, omitting  $\text{Cl}^-$  and contoured at  $2.5\sigma$ , is shown in magenta.

chromatographyMass Spectrometry (nano LC-MS) analysis, which gave a molar mass for apo-MmLarE of  $60,829 \pm 2$  Da, corresponding to the dimeric form (molar mass of monomer of 31.12 kDa) lacking the last six amino

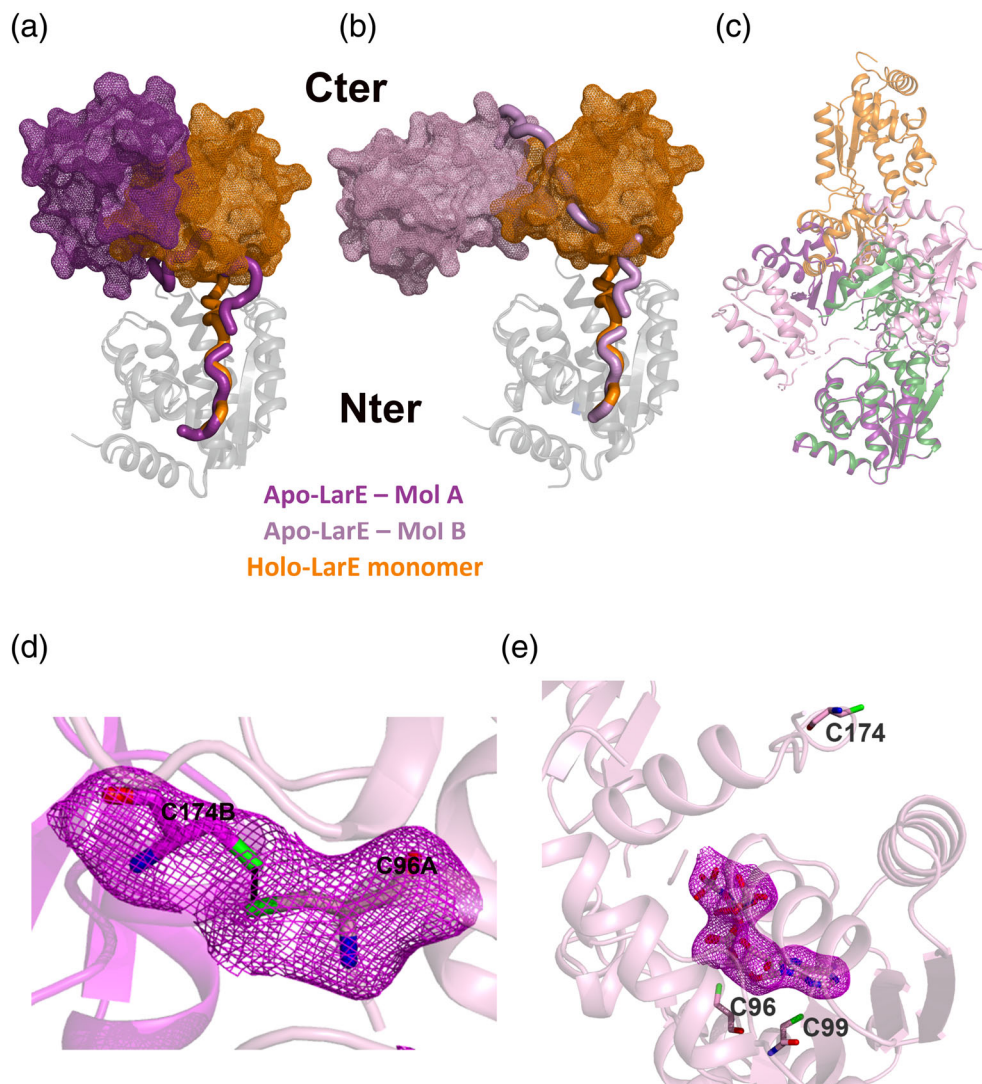
acids (Figure S7B). We noticed that the conformation of the two domains constrained by a disulfide bond in the apo-MmLarE was not predicted by *AlphaFold2*.

The nonhydrolyzable ATP analog, adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP), which was used in co-crystallization, was observed in the active site, with two alternative conformations of the  $\gamma$ -phosphate (Figure 5E). Comparison of the B-factors of the residues from the N- and C-terminal domains in apo-MmLarE shows that the residues from the N-terminal domains have much lower B-factors (mean value of 80.1 and 82.4 Å<sup>2</sup>, for molecules A and B, respectively), than the C-terminal residues (mean value of 146.7 and 171.8 Å<sup>2</sup>, for molecules A and B, respectively), which are not involved in dimerization in apo-MmLarE (Figure S8A). This indicates a high disorder within the crystal of the C-terminal domains, which are not involved in dimeric contacts as observed for holo-MmLarE (Figure 3B). The regions in the C-terminal domains of apo-MmLarE, which are not constrained by crystal contacts (Figure S8B), have a poor electron density so that the side chains of the residues are not well-defined. In contrast to apo-MmLarE, the residues from the N- and C-terminal domains of holo-MmLarE had similar B-factors (mean value of 102.7 Å; Figure S8C).

## 2.7 | Comparison of the holo-MmLarE and LpLarE crystal structures

Superposition of the N-terminal catalytic domains of holo-MmLarE in complex with AMP and LpLarE in complex with nicotinamide mononucleotide (NMN), an analog of the P2CMN substrate, in which one carboxylate is replaced by an amide group and the second carboxylate is absent (Figure S9), shows that the two proteins adopt the same fold and are structurally similar (Figure 6A). But it also highlights different relative orientations of the N- and C-terminal domains in both crystal structures, likely reflecting a different oligomeric state in solution, dimeric for holo-MmLarE and hexameric for LpLarE (Fellner et al., 2017). This confirms the flexibility of the N- and C-terminal domains relative to each other.

The electrostatic surfaces of holo-MmLarE and LpLarE are very similar, displaying highly positive pockets to bind the phosphate groups of AMP/ATP and that of the substrate (Figure 6C), formed by conserved residues (Figure 6D). A nonconserved region surrounding the binding pocket of LpLarE (G207–V211 and P225–A227; red circle in Figure 6C) is more positive in LpLarE than in MmLarE. The adenine ring of AMP/ATP/AMP-PNP stacks with Ser29, and the hydroxyl groups of the ribose form H-bonds with the NH group of Gly122 (MmLarE



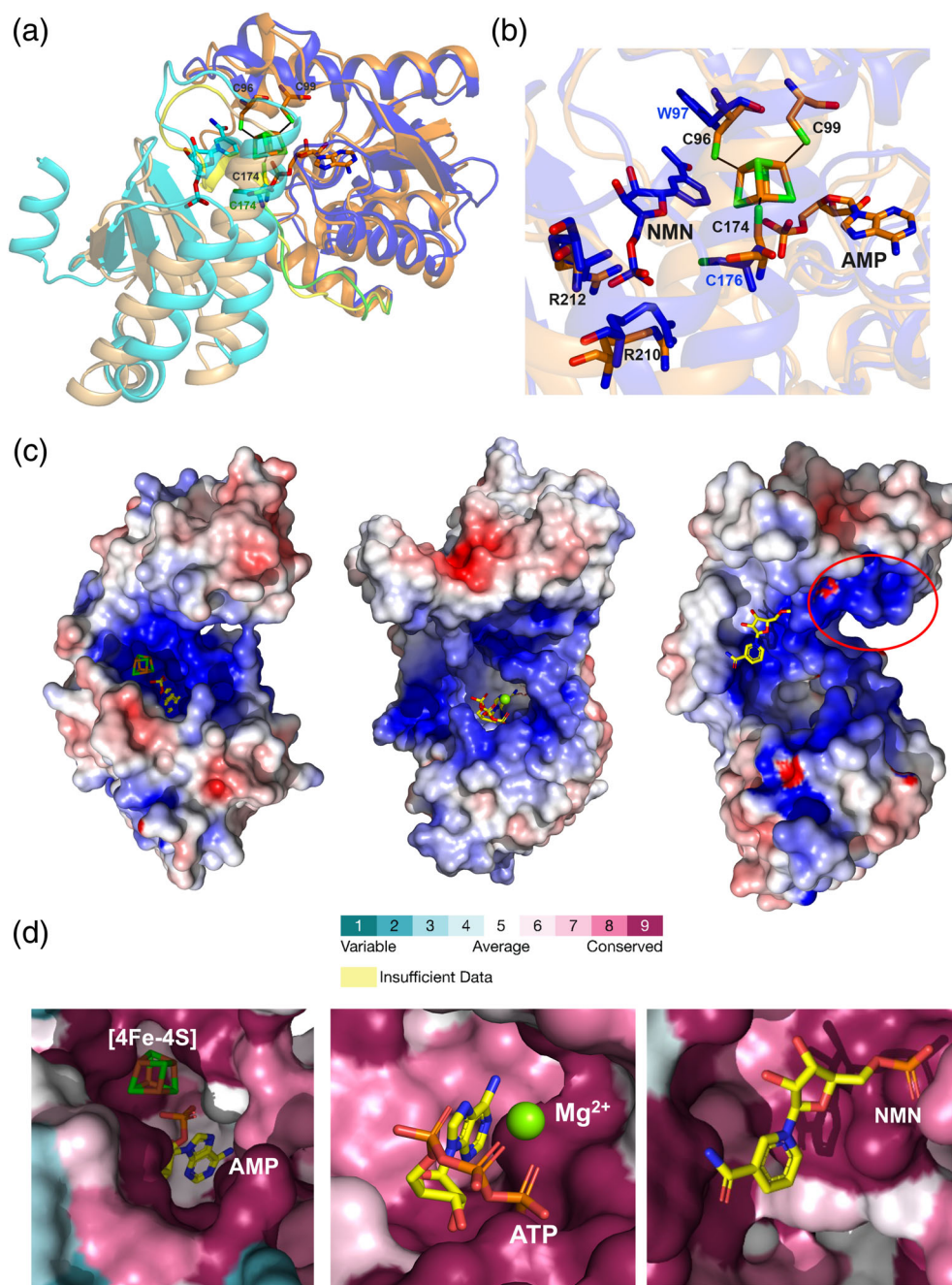
**FIGURE 5** The apo-MmLarE structure. (a) Superposition of the N-terminal domains of molecules A of apo-MmLarE and holo-MmLarE with LSQ in COOT (RMSD of 1.56 Å over 156 C $\alpha$  atoms). The C-terminal domains display a rotation angle of 125° and translation of 17 Å. (b) Superposition of the N-terminal domains of molecule B of apo-MmLarE and of one monomer of holo-MmLarE (RMSD of 1.37 Å over 156 C $\alpha$  atoms). The C-terminal domains display a rotation angle of 167° and translation of 27 Å. (c) Comparison of the dimers of holo-LarE (monomers in orange and green) and apo-LarE (monomers in violet and pink). (d) Zoom of the disulfide bond between CysA96 (molecule A) and CysB174 (molecule B), which links the two molecules in the asymmetric unit in apo-MmLarE. An electron density map omitting the two cysteines and contoured at 2  $\sigma$  was superimposed onto the structure. (e) AMP-PNP is present in the active site of apo-MmLarE. The  $\gamma$ -phosphate displays two alternative conformations. An electron density map, omitting AMP-PNP and contoured at 2.5  $\sigma$ , is shown in magenta.

numbering; Figure S10). The  $\alpha$ -phosphate of AMP-PNP is bound by the N $\epsilon$  atom of Lys100 in MmLarE. Like in other PP-loop pyrophosphatases, the PP-loop motif (residues 29–34 in MmLarE, Figure S1) is involved in binding the  $\gamma$ -group of the ATP cofactor, as shown in the apo-MmLarE/AMP-PNP and LpLarE/ATP complexes (Figure S10). In addition, the “RPG”-containing loop (corresponding to residues 132–134 in MmLarE), characteristic of LarE proteins, is involved in nucleotide binding. Interestingly, in LpLarE, this loop was shown to get ordered upon AMP binding (Fellner et al., 2017). Whereas AMP-PNP in apo-MmLarE and ATP in LpLarE are nearly superimposable, with the

equivalent residues being used for nucleotide binding (Figure S10A,B), AMP in holo-MmLarE and in LpLarE displays different conformations (Figure S10A,C), likely because the phosphate group of AMP is bound to the [4Fe-4S] cluster in holo-MmLarE.

The comparison of the binding sites of holo-MmLarE and LpLarE highlights also similar positioning of the conserved residues Arg210 and Arg212 (Figures S1 and 6B). Since these residues are involved in the binding of the phosphate group of the substrate analog in the crystal structure of LpLarE in complex with NMN (Figure 6B) or a phosphate ion occupying the same position in the LpLarE/ATP





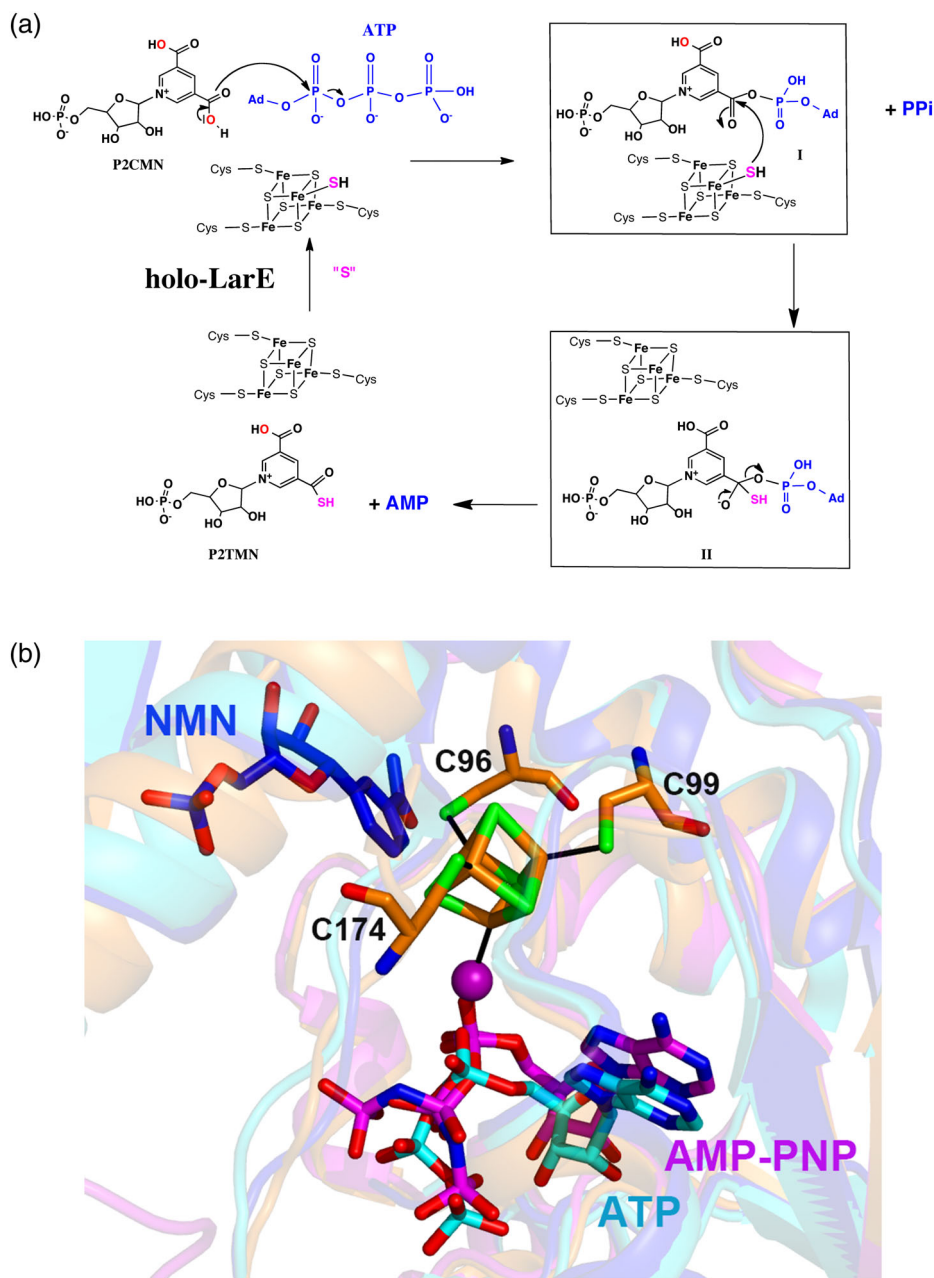
**FIGURE 6** Comparison of the crystal structures of holo-MmLarE and LpLarE monomers. (a) Superposition of the N-terminal domains of molecule A of holo-MmLarE (in orange) in complex with AMP, and LpLarE (in blue) in complex with NMN (PDB code [5UDR](#), mol A) in *PYMO*L. The RMSD was 1.2 Å over 616 C $\alpha$ s. The C-terminal domains of holo-MmLarE and LpLarE are shown in tan and cyan, respectively, with the linkers in yellow (MmLarE) and green (LpLarE). NMN (from the LpLarE crystal) and AMP (from the MmLarE crystal) are shown as sticks, in the same color as the domain to which they belong. The cluster of holo-MmLarE is shown in stick representation. (b) Zoom of the superposed active sites of holo-MmLarE and LpLarE. (c) Electrostatic surface of holo-MmLarE in complex with AMP (left) and LpLarE in complex with ATP and Mg<sup>2+</sup> (green sphere; PDB code [5UDS](#), middle) or NMN (PDB code [5UDR](#), right), calculated with *APBS* and colored by the electrostatic potential from red (negative charge) to blue (positive charge). The ligands and cluster are shown in stick representation. (d) Zoom of the active sites of the structures shown in (a) colored by residue conservation using *CONSURF* (Yariv et al., 2023).

complex, the equivalent residues are also likely involved in the binding of the phosphate group of the P2CMN substrate in MmLarE.

Interestingly, one of the cysteines (Cys174), which ligates the [4Fe-4S] cluster in MmLarE, occupies a

position similar to that of sacrificial Cys176 of LpLarE (their C $\alpha$  atoms are 1.7 Å away in the superposition), whereas another cysteine ligand (Cys96) in MmLarE occupies the site of Trp97 in LpLarE (Figure 6B), an invariant residue within the LarE enzymes belonging to

**FIGURE 7** Catalytic mechanism and model of substrate analog NMN bound to holo-MmLarE. (a) Proposed catalytic mechanism of ATP-dependent [4Fe-4S]-containing LarE enzymes, in which the sulfur atom attached to a [4Fe-5S] cluster intermediate is used as a sulfur donor for the thiolation reaction. This mechanism involves the formation of a P2CMN adenylyate intermediate I and a tetrahedral hydrogenosulfoadenylyate intermediate II. (b) Superposition of the crystal structures of holo-MmLarE (molecule B, in orange), apo-MmLarE in complex with adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP; in magenta) and LpLarE in complex with NMN (PDB code 5UDR, in blue) or ATP (PDB code 5UDS, in cyan). In this model of NMN bound to holo-MmLarE, the chloride atom attached to the cluster (shown as a magenta sphere), which mimics the sulfur atom used as the sulfur donor for the thiolation reaction, is located 5.4 Å away from the C4 carbon atom of the nicotinamide ring of NMN, which becomes adenylylated.



the class of sacrificial LpLarE proteins (Figure S1). Furthermore, Trp97 adopts different conformations in the various chains of the LpLarE crystal structure in complex with NMN. In both of them, Trp97 stacks against the nicotinamide ring of the substrate analog, indicating that it serves to stabilize a reactive conformation of the substrate (Figure 6B).

## 2.8 | Models of catalytic intermediates along the LarE-catalyzed reaction

A catalytic mechanism used by [Fe-S]-dependent LarE enzymes, involving the formation of an adenylyated

intermediate and a [4Fe-5S] cluster, was proposed by Chatterjee et al. (2022) based on their spectroscopic and biochemical characterization of TmLarE (Figure 7A), extending to LarE a mechanism we previously proposed for sulfuration of tRNAs catalyzed by [4Fe-4S] enzymes such as TtuA (Arragain et al., 2017), TtcA (Bouvier et al., 2014) and NcsA (Bimai et al., 2023). To visualize the different steps in catalysis, the main catalytic intermediates along the reaction were modeled (Figure S11, see details in Section 4.1). First, a model of holo-MmLarE bound to the PC2MN substrate and ATP was built (Figure S11A), based on the superposition of the structures of holo-MmLarE with chloride bound to the cluster (molecule B), apo-MmLarE in complex with AMP-PNP,

and LpLarE in complex with NMN or ATP (Figure 7B). NMN was then replaced in *COOT* by P2CMN, and a [4Fe-5S] cluster was built by substituting the chloride ion by a hydrogensulfide ion. This initial complex (Figure S11) was energy-minimized with *PHENIX*. Next, a model of adenylated intermediate I bound to holo-MmLarE was built by bringing the P2CMN molecule into proximity with ATP (while maintaining ATP anchored by the PP-loop) using *COOT* to form a covalent bond between the oxygen atom of one of the carboxylic groups of P2CMN and the  $\alpha$  phosphorus atom of ATP (Figure S11). A model of the tetrahedral adenylated intermediate II bound to holo-MmLarE, after transfer of the sulfur atom from the [4Fe-5S] cluster, and a model of the first product complex, containing AMP and P2TMN, were also built (Figure S11C).

The same procedure was performed to model the main intermediates along the LpLarE-catalyzed reaction (Figure S12) to finely compare the active sites of the MmLarE and LpLarE enzymes during catalysis and obtain hints about the different catalytic mechanisms used. First, some differences are observed in the residues involved in the binding of the ribose hydroxyl groups of the substrate: whereas Tyr184, from the conserved motif RXPYG (Figures S1 and S13) of LpLarE, binds the two hydroxyl groups of the P2CMN ribose (Figure S12), this function is fulfilled by Arg95 in MmLarE (Figure S11B), which does not possess the conserved motif. The position of Arg95 in MmLarE corresponds to that of one of the conformers of Trp97 in LpLarE, which stabilizes the nicotinamide substrate via stacking interactions.

Second, the two adenylated intermediates are stabilized by the equivalent conserved residues in MmLarE and LpLarE: Lys100 in MmLarE (Lys101 in LpLarE; Figures S1 and S13) that forms hydrogen bonds with both adenylated intermediates, but not with ATP or AMP, when bound to the PCMN substrate, and Arg132 in MmLarE (Arg133 in LpLarE) that interacts with the  $\alpha$  phosphate group of ATP/AMP and brings together the P2CMN substrate and ATP to create a covalent bond linking them and form the adenylated intermediates.

### 3 | DISCUSSION

#### 3.1 | Sulfur insertases use various catalytic mechanisms

Sulfur, an essential element for a variety of cellular constituents in all living organisms, is present in several cofactors, vitamins, and thionucleosides within tRNA (Shigi, 2018; 2021). The enzymes involved in the biosynthesis of these thio-molecules display a large array of catalytic mechanisms (Chatterjee & Hausinger, 2022).

Whereas the biosynthesis of lipoic acid, biotin, and  $ms^2i^6A37$ -tRNA requires S-adenosyl-L-methionine-radical enzymes to insert sulfur within an unactivated C—H bond (Cicchillo et al., 2004; Fontecave et al., 2003; Forouhar et al., 2013; Fugate & Jarrett, 2012), the enzymes that catalyze the nonredox substitution of an oxygen atom by a sulfur atom (Bimai et al., 2020), like LarE, display a PP-loop motif characteristic of an ATP-binding site, and activation of the target atom by ATP occurs through the formation of a catalytically competent adenylated intermediate. Although all ATP-dependent sulfur-inserting enzymes possess at least one conserved cysteine that plays a role in catalysis, they were shown to use various catalytic strategies. For example, U8-tRNA sulfurase from *Escherichia coli* possesses a second catalytic cysteine within a rhodanese domain, which serves to form a catalytic persulfide, whereas the conserved cysteine is used as a nucleophile to break a disulfide bond formed during the reaction (Mueller et al., 2001). Several other tRNA thiolation enzymes were shown to bind a [4Fe-4S] cluster, bound by three conserved cysteines, with the fourth nonprotein-bonded Fe atom being capable of binding a hydrogensulfide ion, which is used as the sulfur donor. Among them, several enzymes (MmA and NcsA operating on C2 of U34 (Bimai et al., 2023; Shigi et al., 2020; Zhou, Lénon, et al., 2021), TtuI on C4 of U8 (He et al., 2022) and TtuA on C2 of U54 (Arragain et al., 2017; Chen et al., 2017, 2020; Zhou et al., 2022) have been recently biochemically and/or structurally characterized (Bimai et al., 2020; Shigi 2021). Finally, LpLarE sacrifices its conserved cysteine, which is used as the sulfur donor (Fellner et al., 2017). The crystal structure of LpLarE (Fellner et al., 2017) was the only known crystal structure of a LarE enzyme up to now.

#### 3.2 | A [4Fe-5S] catalytic intermediate likely serves as a sulfur donor in [4Fe-4S]-dependent LarE enzymes

We report here the first crystal structures of a [4Fe-4S]-dependent LarE enzyme. The structure of holo-MmLarE revealed the presence of a [4Fe-4S] cluster, bound at the interface between the N- and C-terminal domains, which is chelated to the protein by only three cysteine ligands, leaving a free coordination site on one iron atom. Interestingly, an AMP molecule, inadvertently bound in one of the molecules in the asymmetric unit, indicated that the [4Fe-4S] cluster is located in the catalytic site, in proximity to the ATP-binding site. Similarly, an AMP molecule, which appeared to have copurified with the protein, has previously been observed in the crystal



structure of the [4Fe-4S]-dependent U54-tRNA thiolation enzyme TtuA (Arragain et al., 2017). Moreover, in the other molecules in the asymmetric unit, the [4Fe-4S] was bound to a smaller ligand, which was assigned to a chloride ion coming from the crystallization solution. A chloride-bound [4Fe-4S] cluster has also been observed in the crystal structure of quinolate synthase, which catalyzes a [4Fe-4S]-dependent dehydration reaction (Fenwick & Ealick, 2016). We propose that the chloride ion in the holo-MmLarE crystal structure mimics the hydrogenosulfide ion attached to the cluster that serves as the sulfur donor in the thiolation reaction, as proposed previously for TmLarE (Chatterjee et al., 2022), but also for several tRNA thiolation enzymes (Arragain et al., 2017; Bimai et al., 2023; Chen et al., 2017, 2020; He et al., 2022; Shigi et al., 2020; Zhou et al., 2022; Zhou, Lénon, et al., 2021; Figure 7A). The catalytic mechanism would thus involve the formation of an adenylated intermediate followed by a nucleophilic attack of the sulfur atom of the [4Fe-5S]-containing MmLarE on the adenylated intermediate. In the crystal structures of the tRNA thiolation enzymes TtuA and NcsA, a small anionic ligand was also bound to the [4Fe-4S] cluster (Arragain et al., 2017). Furthermore, a [4Fe-5S] catalytic intermediate has previously been trapped in the crystal structure of thiouracil desulfidase (Zhou et al., 2022; Zhou, Pecqueur, et al., 2021), an enzyme that catalyzes a desulfuration reaction, that is, the opposite reaction to that catalyzed by LarE.

Altogether, our structural data are in full agreement with the catalytic assays of [4Fe-4S]-dependent TmLarE (Chatterjee et al., 2022; Fellner, Rankin, et al., 2018). In these tests, the P2CMN substrate, which is not commercially available and nontrivial to synthesize, came from the incubation mixture of LarB with NaAD and NaHCO<sub>3</sub> (Figure 1). Either Liquid Chromatography ESI-MS was used to monitor the disappearance of the substrate and appearance of the monothiolated and bithiolated products, or the formation of the P2TMN product was quantified by measuring the formation of L-lactate by an enzymatic kit after coupling the LarE reaction with the LarC and LarA-catalyzed reactions (Figure 1). These two kinds of activity tests showed that the cluster was essential for the thiolation activity of TmLarE and that a stoichiometric amount of the P2TMN product was formed without adding an exogenous sulfur source, suggesting the presence of a [4Fe-5S] species. This species has likely been formed during assembly of the cluster. Yet, a substantial increase of activity was observed when cysteine together with cysteine desulfurase IscS was used as a sulfur donor (Chatterjee et al., 2022).

### 3.3 | The active site of MmLarE is very similar to that of LpLarE apart from the cluster binding residues

MmLarE exhibited the same fold as LpLarE and a similar active site structure, despite the low sequence identity between the two proteins (26.8%). Using crystal-based modeling of the main catalytic intermediates of MmLarE and LpLarE, we did not discover major structural differences regarding the protein environment of the reactive centers, namely the [4Fe-4S] cluster and its three cysteines for MmLarE, and the sacrificial cysteine for LpLarE, which are actually found in the same location. In particular, in both enzymes, two conserved residues corresponding to Lys100 and Arg132 in MmLarE, appear to have the same crucial role in catalysis, for bringing together the two substrates and for stabilizing the adenylated intermediates. Moreover, based on the crystal structure of LpLarE and site-directed mutagenesis, it was proposed that Arg181, assisted with Glu200—with which it forms a bidentate ionic interaction—may abstract the C $\alpha$  proton of Cys176 (Fellner et al., 2017). However, both Arg181 and Glu200 in LpLarE are fully conserved in both types of LarE proteins (respectively Arg178 and Glu196 in MmLarE; Figures S1 and S13), which may indicate another function of these residues common to the two proteins.

Finally, given that the sulfuration activity of TmLarE was greatly increased and became catalytic when sulfur was supplied by cysteine and cysteine desulfurase (Chatterjee et al., 2022), the question is raised whether LpLarE could function as a nonsacrificial enzyme and use a different mechanism, when supplied with a sulfur source.

## 4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 4.1 | Heterologous gene overexpression of MmLarE

The *mmp1239* gene encoding MmLarE from *M. maripaludis* strain S2 (NC\_005791.1) was synthesized by Eurofins with codon optimization for expression in *E. coli* and subcloned into pET15b (Studier et al., 1990) between the NdeI and BamHI restriction sites to add a 6-histidine tag at the N-terminus, which could be cleaved by the H3C protease. The corresponding protein in UNIPROT (Q6LXV7), which was released later, lacks the nine N-terminal amino acids (MLEVLFQGP).

Competent *E. coli* BL21 (DE3) Star Codon+ cells were transformed with the *larE*-containing plasmid to

overexpress MmLarE. A single colony was used to inoculate 200 mL of Luria Broth medium supplemented with ampicillin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). 40 mL of this preculture, grown overnight at  $37^\circ\text{C}$ , was then used to inoculate 4 L of the same medium. Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  until the  $\text{OD}_{600}$  reached 0.6 and protein expression was induced at  $16^\circ\text{C}$  with 0.5 mM isopropyl- $\gamma$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were incubated for 18 h at  $16^\circ\text{C}$ , collected by centrifugation at  $4000g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) for 15 min, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

## 4.2 | Aerobic purification of MmLarE

Cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, containing RNase A ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fisher), protease inhibitor cocktail (Roche, one tablet per 50 mL), 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM imidazole, and disrupted by sonication. Cells debris were removed by centrifugation at 35,000 rpm for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was then purified using Ni-NTA affinity chromatography ( $2 \times 5$  mL HisTrap<sup>TM</sup> FF columns, Cytiva) in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and with a linear gradient of 5–500 mM imidazole at 1.5 mL per min in 100 min. The protein was collected, dialyzed twice against 3 L of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol in the presence of the PreScission Protease (25 mg per mg MmLarE). After concentration with a Vivaspin 20 ultrafiltration membrane (10 kDa cutoff, Sartorius), the protein was further purified at  $1 \text{ mL min}^{-1}$  onto a gel filtration column (Hiload 16/60 Superdex 75, Cytiva) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, using an ÄKTA system. The “as-purified” protein was concentrated to  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  with an Amicon Ultra filter device (10 kDa cutoff), frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The purity of MmLarE was assessed along the purification steps using Sodium Dodecyl-Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis gels and its concentration determined using the Bradford assay (Bradford, 1976; Biorad) using BSA as the standard.

The GST-3C-protease (a gift from S. Mouilleron) was expressed using pGEX-2 T recombinant plasmids. After induction at  $25^\circ\text{C}$  with 0.1 mM IPTG for 20 h, the protein was purified using glutathione-Sepharose chromatography.

## 4.3 | In vitro [Fe-S] cluster reconstitution and purification of holo-MmLarE

The reconstitution of the [4Fe-4S] cluster and purification of holo-MmLarE was performed in a glove box (MBraun) containing less than 0.5 ppm  $\text{O}_2$ . As-purified

MmMarE (100  $\mu\text{M}$ ) was first incubated with 10 mM DTT for 15 min. Then, a 5-fold molar excess of ferrous ammonium sulfate and L-cysteine was added along with *E. coli* cysteine desulfurase CsdA (2  $\mu\text{M}$ ). Cluster reconstitution was followed by UV-visible spectroscopy (XL-100 UVI-CON spectrophotometer equipped with optical fibers) and incubation stopped when  $\text{OD}_{410}/\text{OD}_{280} > 0.3$ . After centrifugation for 30 min at 20,000 g, holo-MmLarE was loaded onto a Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtration column (Cytiva) equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT. The protein was then concentrated to  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  on a Vivaspin concentrator (10 kDa cutoff, Sartorius), frozen and stored in liquid nitrogen in sealed tubes.

## 4.4 | SEC-MALS analysis

SEC-MALS experiments were performed using an HPLC-MALS system (Shimadzu) equipped with light scattering detector (mini-DAWN TREOS, Wyatt Technology), refractive index detector (Optilab T-rEX, Wyatt Technology) and UV detector (SPD-20A, Shimadzu). Apo- or holo-MmLarE (100  $\mu\text{L}$  at  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was injected on a Superdex 200 10/300 GL Increase column (Cytiva) equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT at a flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . The molar mass was calculated with the ASTRA 6.1 software (Wyatt Technology) using the Forward Monitor (FM) mode to take into account the fact that the holo-protein absorbs light at the laser wavelength (Velours et al., 2022). A refractive index increment ( $\text{dn}/\text{dc}$ ) value of  $0.183 \text{ mL g}^{-1}$  was used.

## 4.5 | Mössbauer spectroscopy

The  $^{57}\text{Fe}$  metal used for Fe labeling for Mössbauer spectroscopy was rinsed twice with trichloromethane, then solubilized in the glove box with 1.5 molar equivalent  $\text{H}_2\text{SO}_4$  by heating at  $60^\circ\text{C}$  for 24 h then  $78^\circ\text{C}$  for 1 h, under agitation. After centrifugation to remove undissolved particles, the Fe concentration was determined with a calibration curve and the Fish method (Fish, 1988). For Mössbauer spectroscopy, as-purified MmLarE was prepared as above, with ferrous ammonium sulfate being replaced by  $^{57}\text{Fe}$  during the cluster reconstitution step. Labeled holo-LarE (0.54 mM) in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 180 mM NaCl, 5 mM DTT was frozen in the glove box and stored in liquid nitrogen. Mössbauer spectra were recorded in the constant acceleration mode with a conventional spectrometer (Wissel GmbH) with a multichannel analyzer (Wissel GmbH) in the time-scale mode. Experiments at 77 K were conducted with an  $\text{LN}_2$

bath cryostat (Oxford Instruments). The same type of spectrometer was used in the measurement of high-field, low temperature spectra combined with a helium closed-cycle cryostat equipped with a superconducting magnet (CRYO Industries of America Inc.) operating with the applied field parallel to the  $\gamma$ -rays. Isomer shifts  $\delta$  are given relative to  $\alpha$ -iron at room temperature. After transfer of the data from the multichannel analyzer to a PC the public domain program Vinda (Gunnlaugsson, 2016) running on an Excel 2003 platform was used to analyze the data. For the simulation of magnetically split spectra the spin Hamiltonian formalism (Gütlich et al., 2011) was utilized. Otherwise, spectra were analyzed by least-squared fits using Lorentzian line shapes.

#### 4.6 | Nano LC-MS analysis of as-purified LarE

Protein mass measurements were performed with an electrospray triple time-of-flight (TOF) 4600 mass spectrometer (ABSciex) coupled to an ultra-performance liquid chromatography system (RSLCnano, Thermo Scientific). After loading and desalting the protein sample on a C4  $\mu$ -Precolumn reversed-phase (PepMap™ 300 C4, 5 mm length), ESI-MS measurements were conducted in the positive mode, with data being collected for  $m/z$  in the range 500–3000. Collision energy was set to 15 eV and nitrogen was used as the collision gas. The Analyst 1.7.1 and Peakview 2.2 softwares were used for acquisition and data processing, respectively. The MaxEnt algorithm was used for mass spectra deconvolution. External calibration was performed using the six-peptide mixture (Sciex).

#### 4.7 | Crystallization, x-ray data collection, and processing

Crystals of apo-LarE ( $0.2 \times 0.2 \times 0.2$  mm) were obtained at 18°C in hanging drops by vapor diffusion by mixing 2  $\mu$ L of protein at 10 mg ml<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.15 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 5 mM AMP-PNP with 2  $\mu$ L of a 1 mL reservoir solution (1.6 M ammonium sulfate, 2% PEG 400, 0.1 M HEPES pH 7.5, 5 mM AMP-PNP). For cryoprotection, crystals were soaked for a few minutes in the same solution supplemented with 25% glycerol and 5 mM AMP-PNP before flash-freezing in liquid nitrogen. Crystals of holo-MmLarE ( $0.152 \times 0.2 \times 0.2$  mm) were grown anaerobically at 18°C using the hanging drop method by mixing 2  $\mu$ L of protein at 3 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.15 M NaCl with 1  $\mu$ L of a reservoir solution containing 4.1 M NaCl, 0.1 M HEPES pH 7.5, and either

0.1 M NaI for Crystal 1 or 10% glycerol for Crystal 2 (Table 1). For cryoprotection, Crystal 1 was briefly soaked in a solution mixture of paraffine (Hampton research) in a 1:1 ratio. Crystals 1 and 2 were flash-frozen under anaerobic conditions using liquid propane.

Diffraction data were collected on the PROXIMA 1 beamline (Chavas et al., 2021) at the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France) using an EigerX-16M detector (DECTRIS Ltd; Table 1). The reflection data of apo-MmLarE and holo-MmLarE (Crystal 2) were indexed and integrated using *XDS*, scaled and merged with *XSCALE*, and the intensities were converted to structure factor amplitudes using *XDS CONV* (Kabsch, 2010). Automatic data indexing by *XDS* revealed that the crystal lattice was primitive hexagonal. The *phenix.xtriage* program (Adams et al., 2010) was used to check for crystal pathologies and detect noncrystallographic symmetry (NCS).

Data collected at the iron edge (7.125 keV), as determined by a fluorescence emission scan, on holo-MmLarE (Crystal 1) were processed with the *autoPROC* pipeline (Vonrhein et al., 2011). The output from *STARANISO* was used since the data showed substantial anisotropy with resolution limits of 3.11/4.06/3.38 Å along the  $a^*/b^*/c^*$  reciprocal axes, respectively. Seven heavy atoms were found in the asymmetric unit with *SHELXD* (Sheldrick, 2008; 5000 iterations; CFOM 44). These sites were used as input for *PHASER* in *CCP4* (Winn, 2011), followed by 5 cycles of density modification with *PARROT* (Cowtan, 2010) using data up to 4 Å resolution. Seven copies of a model, calculated with the recently released *trRosetta* program (Yang et al., 2020), which was in the beta mode at that time, were successfully fitted in the experimental map using *ChimeraX* (Goddard et al., 2018), and refined with *DEN* (Schröder et al., 2010), followed by *phenix.rosetta\_refine* (DiMaio et al., 2013), which led to  $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$  of 0.40/0.49, respectively. Since NCS restraints are not applied in *PHENIX.ROSETTA\_REFINE*, a model with seven identical chains was then generated, and subjected to *phenix.real\_space\_refine* using one rigid-body domain per chain for each of the N-terminal (14–178) and C-terminal (194–257) domains, with morphing, secondary structure restraints and NCS constraints. This step improved the map correlation coefficient from 0.509 to 0.587. The resulting model was then used as input for *CRANK2* in MR-SAD mode (Skubák & Pannu, 2013), which dramatically improved the model to  $R_{\text{work}}$  0.314, with a figure of merit of 0.876. The final model was obtained by alternating manual building in *COOT* (Emsley et al., 2010) and refinement in *autoBUS-TER* (Bricogne et al., 2016) using NCS restraints (Smart et al., 2012) and two TLS groups per chain (Schomaker & Trueblood, 1968) using the data collected at 12.67 keV on the same crystal.



The structure of apo-MmLarE was solved by molecular replacement using the structure of holo-MmLarE obtained by experimental phasing. Initially, a partial solution containing two N-terminal domains (61% solvent), was obtained using *PHENIX-Phaser* (McCoy et al., 2007). The final molecular replacement solution, which included two full-length polypeptidic chains, was obtained using *SAPTF* (Spherically Averaged Phased Translation Function) in *Molrep* (Vagin & Isupov, 2001) by fixing the previously found N-terminal domains and searching for the missing C-terminal domains. The final model was obtained by alternating manual building in *COOT* (Emsley et al., 2010) and refinement in *phenix-refine* (Afonine et al., 2012) using NCS restraints (Headd et al., 2014) and two TLS groups per chain.

#### 4.8 | Identification of copurified compound in as-purified MmLarE and quantification

10  $\mu$ L hydrochloric acid (300  $\mu$ M) was added to 90  $\mu$ L as-purified LarE (300  $\mu$ M) to precipitate the protein and extract noncovalently bound compounds. After centrifugation at 13,500 rpm for 5 min at 4°C, the pH of the supernatant was adjusted to 6.0. The sample was recentrifuged and the supernatant filtered through a 0.22  $\mu$ m filter (Millipore) prior to analysis. The identification and quantification of copurified nucleotides were performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC system equipped with a quaternary pump, as previously reported (Menegollo et al., 2019). The sample (100  $\mu$ L) was injected into a reversed-phase column (Agilent® C18, 2  $\times$  100-mm inner diameter, particle size of 1.8  $\mu$ m) at 0.5 mL min and eluted isocratically with 0.1 M ammonium dihydrogen phosphate pH 6.0, 1% methanol. The absorbance at 254 nm was monitored.

#### 4.9 | Modeling several catalytic intermediates bound to holo-MmLarE

One carboxylate group was added to the NMN substrate analog bound to LpLarE (PDB code 5UDR, chain A) using *COOT* to model the P2CMN substrate. The superposition of this P2CMN-bound LpLarE model and ATP-bound LpLarE crystal structure (5UDS, chain A) onto holo-MmLarE (chain B) using secondary-structure matching in *COOT* (RMSD of 1.80 Å for 223 aligned C $\alpha$ s and 1.804 Å for 223 aligned C $\alpha$ s, respectively) gave the positions of P2CMN and ATP, relative to MmLarE, respectively. Maintaining the adenine ring of AMP and

the phosphate group of PC2MN in place, a manual translation of  $\sim 1.7$  Å of P2CMN in *COOT* was sufficient to bring it sufficiently close to ATP to make a covalent link between the oxygen atom of the carboxylate group of the substrate and the  $\alpha$  phosphorus atom of ATP to give the adenylated intermediate I. The [4Fe-5S] cluster in holo-MmLarE was modeled by replacing the bound chloride atom by a hydrogensulfide ion. Adenylated intermediates I and II were generated using Lidia (Emsley, 2017), the ligand builder program in *COOT*, based on the following SMILES ID (Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]1OC@H[C@H]1O).

Likewise, the models of the LpLarE catalytic intermediates were based on chain A of NMN-bound LpLarE (PDB code 5UDR). PC2MN was built from NMN in *COOT*, and ATP was positioned from ATP-bound LpLarE (PDB code 5UDS, chain A; RMSD of 0.52 Å for 256 aligned C $\alpha$ s). Additional modifications of the model included the incorporation of 18 residues corresponding to the 127–145 loop, which were not observed in NMN-bound LarE, from AMP-bound LpLarE (PDB code 5UDT, chain A), as well as the modeling of the side chain of Asp128 based on the AlphaFold prediction (ID: AF-F9UST4-F1) and that of Lys101 based on ATP-bound LpLarE (PDB code 5UDS, chain C). An alternative conformation of Trp97 was also introduced, corresponding to a distinct conformation observed in chain B of the 5UDR structure.

All models were built by alternating manual positioning of the substrates in *COOT* and minimizing the energy of the model using the Geometry-Minimization program in *PHENIX* (Afonine et al., 2012). The interactions were then analyzed using *LIGPLOT* (Laskowski & Swindells, 2011). The models are accessible at the following link <https://www.doi.org>: LpLarE initial state <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.25986.45764>; LpLarE adenylated intermediate 1 <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.30705.04962>; LpLarE adenylated intermediate 2 <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.27349.60645>; LpLarE final state <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.20638.72008>; MmLarE initial state <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.22316.44167>; MmLarE adenylated intermediate 1 <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.24833.02400>; MmLarE adenylated intermediate 2 <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.27349.60645>; MmLarE final state <https://www.doi.org/10.13140/RG.2.2.11411.25128>.

#### 4.10 | Accession numbers

PDB codes: 8CNZ, holo-MmLarE used for SAD phasing; 8CP4, holo-MmLarE refined at 3.2 Å resolution; 8CP3, apo-MmLarE.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Paolo Zecchin:** Data curation; investigation; validation; visualization; writing—review and editing; formal analysis. **Ludovic Pecqueur:** Formal analysis; software; investigation; methodology; writing—review and editing; data curation; validation; visualization. **Jonathan Oltmanns:** Investigation; methodology; validation. **Christophe Velours:** Investigation; methodology; validation. **Volker Schünemann:** Writing—review and editing; validation; methodology. **Marc Fontecave:** Writing—review and editing; validation. **Béatrice Golinelli-Pimpaneau:** Writing—original draft; writing—review and editing; supervision; conceptualization; formal analysis; validation; visualization.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposal 20191181), Pierre Legrand for assistance in using beamline PROXIMA 1, and Laïla Sago for performing nano LC–MS analysis. This work was supported by the French State Program “Investissements d’Avenir” (Grants “LABEX DYNAMO,” ANR-11-LABX-0011) and has benefited from the facilities and expertise of the Macromolecular Interaction Platform of I2BC.

## ORCID

Béatrice Golinelli-Pimpaneau  <https://orcid.org/0000-0001-8248-4704>

## REFERENCES

- Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 2):213–21.
- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix. *Refine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68:352–67.
- Arndt UW, Crowther RA, Mallett JF. A computer-linked cathode-ray tube microdensitometer for x-ray crystallography. *J Sci Instrum.* 1968;1(5):510–6.
- Arragain S, Bimai O, Legrand P, Caillat S, Ravanat JL, Touati N, et al. Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(28):7355–60.
- Beinert H, Holm RH, Münch E. Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures. *Science.* 1997;277(5326):653–9.
- Bimai O, Arragain S, Golinelli-Pimpaneau B. Structure-based mechanistic insights into catalysis by tRNA thiolation enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 2020;65:69–78.
- Bimai O, Legrand P, Ravanat JL, Touati N, Zhou J, He N, et al. The thiolation of uridine 34 in tRNA, which controls protein translation, depends on a [4Fe-4S]-cluster in *Methanococcus maripaludis*. *Sci Rep.* 2023;13:5351.
- Bouvier D, Labessan N, Clemancey M, Latour JM, Ravanat JL, Fontecave M, et al. TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7960–70.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
- Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, et al. BUSTER version 2102 Cambridge. UK: Global Phasing Ltd; 2016.
- Brünger AT. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* 1992;355(6359):472–5.
- Bunkóczi G, Read RJ. Improvement of molecular-replacement models with Sculptor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(4):303–12.
- Chatterjee S, Hausinger RP. Sulfur incorporation into biomolecules: recent advances. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2022;57(5–6):461–76.
- Chatterjee S, Parson KF, Ruotolo BT, McCracken J, Hu J, Hausinger RP. Characterization of a [4Fe-4S]-dependent LarE sulfur insertase that facilitates nickel-pincer nucleotide cofactor biosynthesis in *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem.* 2022;298(7):102131.
- Chavas LMG, Gourhant P, Guimaraes BG, Isabet T, Legrand P, Lener R, et al. PROXIMA-1 beamline for macromolecular crystallography measurements at synchrotron SOLEIL. *J Synchrotron Rad.* 2021;28:970–6.
- Chen M, Asai SI, Narai S, Nambu S, Omura N, Sakaguchi Y, et al. Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(19):4954–9.
- Chen M, Ishizaka M, Narai S, Horitani M, Shigi N, Yao M, et al. The [4Fe-4S] cluster of sulfurtransferase TtuA desulfurizes TtuB during tRNA modification in *Thermus thermophilus*. *Commun Biol.* 2020;3(1):168.
- Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, et al. Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry.* 2004;43(21):6378–86.
- Cowtan K. Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66:470–8.
- Desguin B, Goffin P, Viaene E, Kleerebezem M, Martin-Diaconescu V, Maroney MJ, et al. Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system. *Nat Commun.* 2014;5:3615.
- Diederichs K, Karplus PA. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol.* 1997;4(4):269–75.
- Diederichs K, Karplus PA. Better models by discarding data? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013;69(7):1215–22.
- DiMaio F, Echols N, Headd JJ, Terwilliger TC, Adams PD, David Baker D. Improved low-resolution crystallographic refinement with phenix and Rosetta. *Nat Methods.* 2013;10(11):1102–4.
- Emsley P. Tools for ligand validation in COOT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2017;73:203–2010.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 4):486–501.

- Fellner M, Desguin B, Hausinger RP, Hu J. Structural insights into the catalytic mechanism of a sacrificial sulfur insertase of the N-type ATP pyrophosphatase family, LarE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(34):9074–9.
- Fellner M, Hausinger RP, Hu J. A structural perspective on the PP-loop ATP pyrophosphatase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2018;53(6):607–22.
- Fellner M, Rankin JA, Desguin B, Hu J, Hausinger RP. Analysis of the active site cysteine residue of the sacrificial sulfur Insertase LarE from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry*. 2018;57(38):5513–23.
- Fenwick MK, Ealick SE. Crystal structures of the iron-sulfur cluster dependent quinolinate synthase in complex with dihydroxyacetone phosphate, iminoaspartate analogs, and quinolinate. *Biochemistry*. 2016;55(30):4135–9.
- Fish WW. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol*. 1988;158:357–64.
- Fontecave M, Ollagnier-de-Choudens S, Mulliez E. Biological radical sulfur insertion reactions. *Chem Rev*. 2003;103(6):2149–66.
- Forouhar F, Arragain S, Atta M, Gambarelli S, Mouesca JM, Hussain M, et al. Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nat Chem Biol*. 2013;9(5):333–8.
- Fugate CJ, Jarrett JT. Biotin synthase: insights into radical-mediated carbon-sulfur bond formation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(11):1213–22.
- Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*. 2018;27(1):14–25.
- Goffin P, Deghorain M, Mainardi JL, Tytgat I, Champomier-Vergès MC, Kleerebezem M, et al. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the Cell Wall biosynthesis machinery in *lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*. 2005;187(19):6750–61.
- Golinelli-Pimpaneau B. Prediction of the iron-sulfur binding sites in proteins using the highly accurate three-dimensional models calculated by AlphaFold and RoseTTAFold. *Inorganics*. 2022;10(1):2.
- Gunnlaugsson HP. Spreadsheet based analysis of Mössbauer spectra. *Hyperfine Interact*. 2016;237(1):13–8.
- Gütlich P, Bill E, Trautwein AX. Mössbauer spectroscopy and transition metal chemistry. Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: Springer; 2011.
- He N, Zhou J, Bimai O, Oltmanns J, Ravanat JL, Velours C, et al. A subclass of archaeal U8-tRNA sulfurases requires a [4Fe-4S] cluster for catalysis. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(4):12969–78.
- Headd JJ, Echols N, Afonine PV, Moriarty NW, Gildea RJ, Adams PD. Flexible torsion-angle noncrystallographic symmetry restraints for improved macromolecular structure refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014;70(5):1346–56.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–9.
- Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(2):125–32.
- Krissinel E. Crystal contacts as nature's docking solutions. *J Comput Chem*. 2010;31(1):133–43.
- Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf*. 2011;51(10):2778–86.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst*. 2007;40:658–74.
- Menegollo M, Tessari I, Bubacco L, Szabadkai G. Determination of ATP, ADP, and AMP levels by reversed-phase high-performance liquid chromatography in cultured cells. *Methods Mol Biol. New York Volume 1925*; 2019. p. 223–32.
- Mueller EG, Palenchar PM, Buck CJ. The role of the cysteine residues of ThiI in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33588–95.
- Pandelia ME, Lanz ND, Booker SJ, Krebs C. Mössbauer spectroscopy of Fe/S proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(6):1395–405.
- Schomaker V, Trueblood KN. On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Cryst B*. 1968;24:63–76.
- Schröder GF, Michael Levitt M, Brunger AT. Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data. *Nature*. 2010;464(7292):1218–22.
- Schünemann V. From small molecules to complex systems: A survey of chemical and biological applications of the Mössbauer effect. In: Yoshida Y, Langouche G, editors. *Modern Mössbauer spectroscopy topics in applied physics*. Volume 137. Springer: Singapore; 2021.
- Schünemann V, Meier CB, Meyer-klaucke W, Winkler H, Trautwein AX, Knappskog PM, et al. Iron coordination geometry in full-length, truncated, and dehydrated forms of human tyrosine hydroxylase studied by Mössbauer and X-ray absorption spectroscopy. *J Biol Inorg Chem*. 1999;4:223–31.
- Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A*. 2008;64(1):112–22.
- Shigi N. Recent advances in our understanding of the biosynthesis of sulfur modifications in tRNAs. *Front Microbiol*. 2018;9:2679.
- Shigi N. Biosynthesis and degradation of sulfur modifications in tRNAs. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11937.
- Shigi N, Horitani M, Miyauchi K, Suzuki T, Kuroki M. An ancient type of MnmA protein is an iron-sulfur cluster-dependent sulfurtransferase for tRNA anticodons. *RNA*. 2020;26(3):240–50.
- Skubák P, Pannu NS. Automatic protein structure solution from weak X-ray data. *Nat Commun*. 2013;4:2777.
- Smart OS, Womack TO, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Sharff A, et al. Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012;68(4):368–80.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*. 1990;185:60–89.
- Tickle IJ, Laskowski RA, Moss DS. Rfree and the Rfree ratio. Part I: derivation of expected values of cross-validation residuals used in macromolecular least-squares refinement. *Acta Crystallographica D*. 1998;54:547–57.
- Ueda C, Langton M, Pandelia ME. Characterization of Fe-S clusters in proteins by Mössbauer spectroscopy. *Methods Mol Biol*. 2021;2353:281–305.
- Vagin AA, Isupov MN. Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and

- fragments in electron-density maps. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001;57(10):1451–6.
- Velours C, Zhou J, Zecchin P, He N, Salameh M, Golinelli-Cohen MP, et al. Determination of the absolute molar mass of [Fe-S]-containing proteins using size exclusion chromatography-multi-angle light scattering (SEC-MALS). *Biomolecules*. 2022; 12(2):270.
- Vonrhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, Paciorek W, et al. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67(Pt 4):293–302.
- Winn MD. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67:235–42.
- Yang J, Anishchenko I, Park H, Peng Z, Ovchinnikov S, Baker D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(3): 1496–503.
- Yariv B, Yariv E, Kessel A, Masrati G, Chorin AB, Martz E, et al. Using evolutionary data to make sense of macromolecules with a ‘face-lifted’ ConSurf. *Protein Sci*. 2023;32(3):e4582.
- Zhou J, Bimai O, Arragain S, Pecqueur L, Golinelli-Pimpaneau B. TtuA and TudS, two [4Fe-4S]-dependent enzymes catalyzing non-redox sulfuration or desulfuration reactions. In: Wiley SE, editor. *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry*. Chichester, UK: Wiley; 2022. p. 1–16.
- Zhou J, Lénon M, Touati N, Ravanat J-L, Velours C, Fontecave M, et al. Iron sulfur biology invades tRNA modification: the case of U34 sulfuration. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49:3997–4007.
- Zhou J, Pecqueur L, Aučynaitė A, Fuchs J, Rutkienė R, Vaitekūnas J, et al. Structural evidence for a [4Fe-5S] intermediate in the non-redox desulfuration of thiouracil. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021;60:424–31.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Zecchin P, Pecqueur L, Oltmanns J, Velours C, Schünemann V, Fontecave M, et al. Structure-based insights into the mechanism of [4Fe-4S]-dependent sulfur insertase LarE. *Protein Science*. 2024;33(2):e4874. <https://doi.org/10.1002/pro.4874>

## Supplementary data.

**Table S1. Mössbauer parameters of holo-MmLarE at various B and T.** Component (1) is characteristic of a  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  species and component (2) of nonspecifically bound high-spin  $\text{Fe}^{2+}$ .

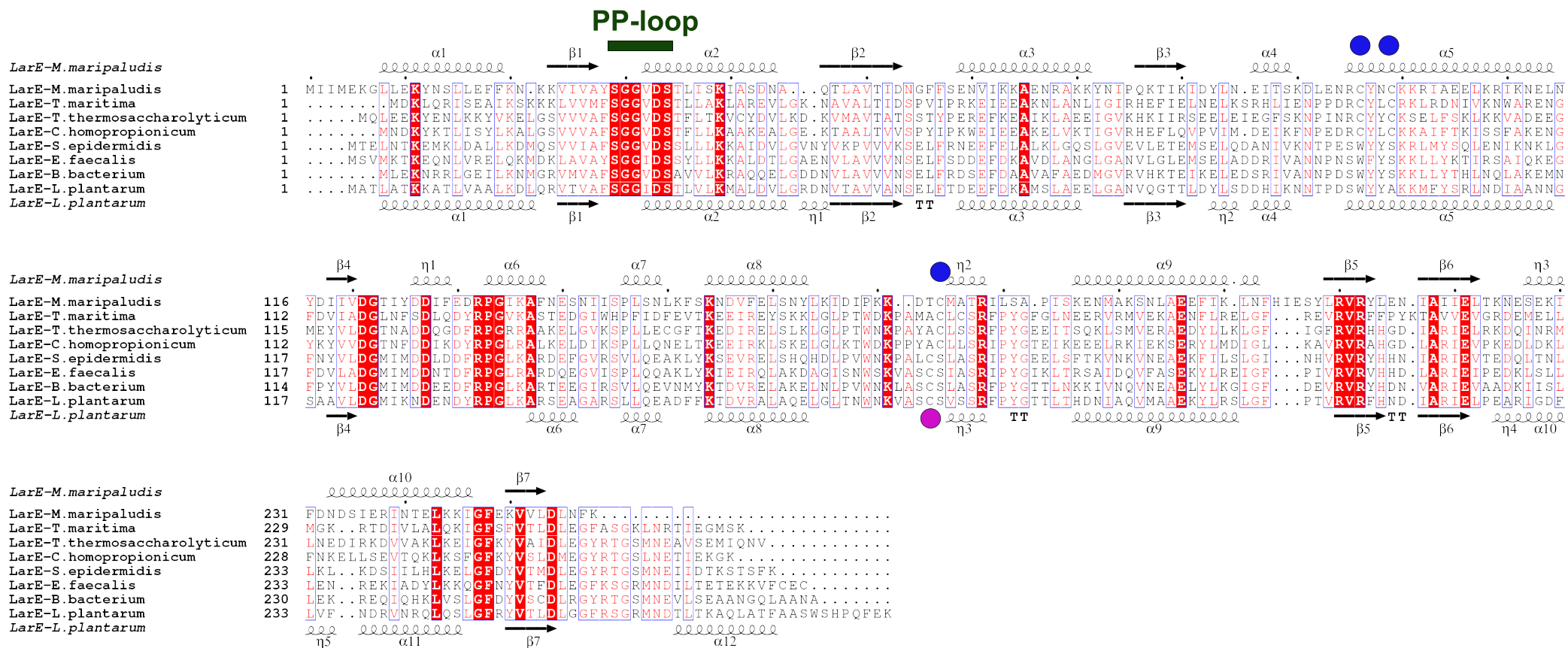
	$T = 77.0 \text{ K}$ $B_{ext} = 0.0 \text{ T}$		$T = 4.2 \text{ K}$ $B_{ext} = 0.1 \text{ T}$		$T = 4.2 \text{ K}$ $B_{ext} = 5.0 \text{ T}$	
$\delta$ (mm s <sup>-1</sup> )	0.43	(1)	1.13	(2)	0.43	(1)
$\Delta E_Q$ (mm s <sup>-1</sup> )	1.14	(1)	2.69	(2)	1.14	(1)
$\Gamma$ (mm s <sup>-1</sup> )	0.35	(1)	0.30	(2)	0.41	(1)
$\eta$						$0.8 \pm 0.1$
Area (%)	97	(1)	3	(2)	100	100

**Table S2. Comparison of the monomers of the holo-MmLarE crystal structure and the AlphaFold model.** The C $\alpha$  traces of the 7 molecules in the asymmetric unit of the holo-MmLarE structure used for phasing and that of the AlphaFold model (AF) were superimposed with ProFitv3 (<http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>). The RMSD over 248 aligned C $\alpha$ s is indicated in Å.

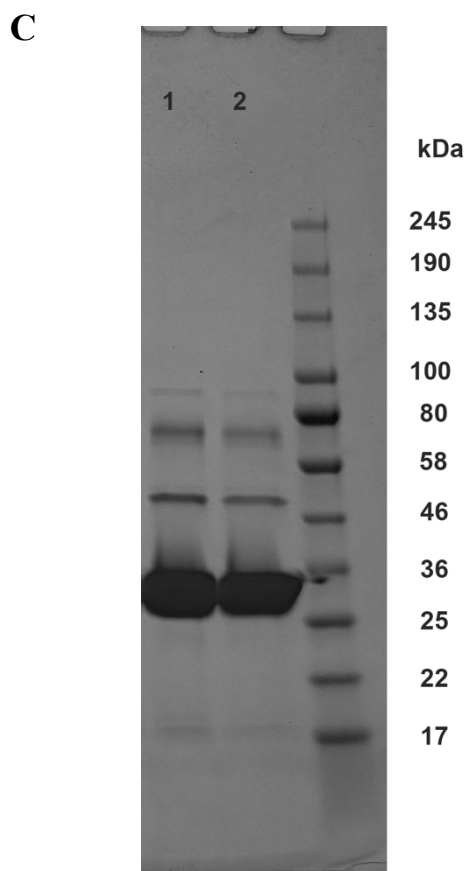
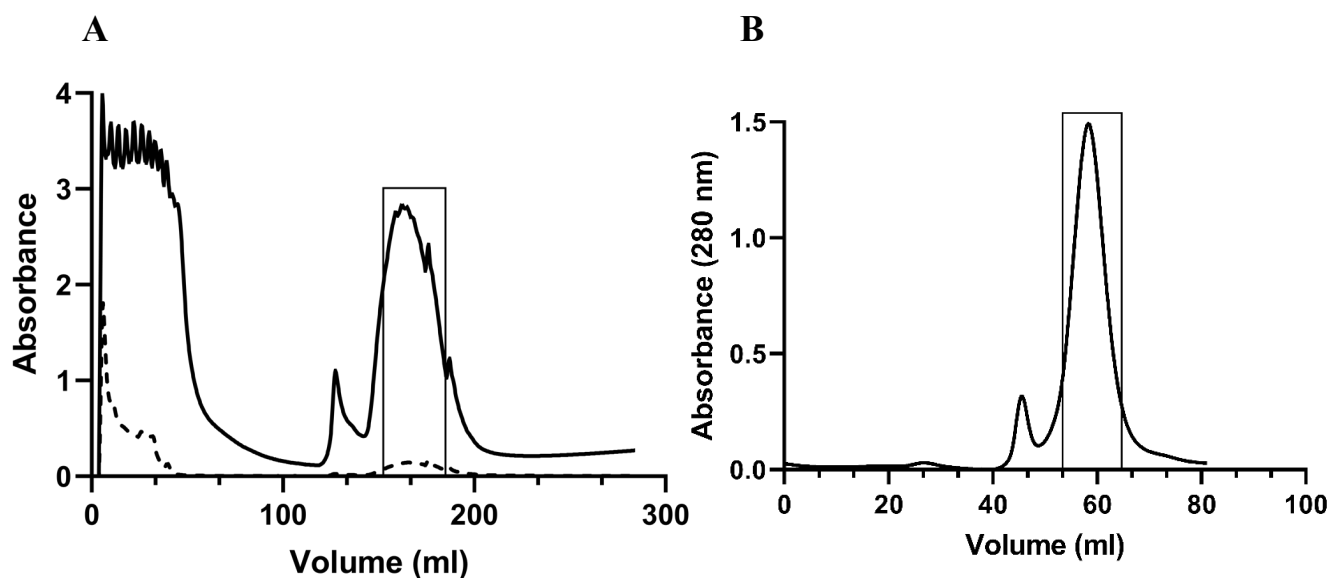
	AF	Chain A	Chain B	Chain C	Chain D	Chain E	Chain F	Chain G
AF	-	0.572	0.829	0.871	0.816	0.752	0.583	0.598
Chain A		-	0.751	0.759	0.743	0.623	0.4	0.4
Chain B			-	0.416	0.36	0.315	0.638	0.541
Chain C				-	0.3	0.363	0.701	0.643
Chain D					-	0.317	0.689	0.642
Chain E						-	0.59	0.474
Chain F							-	0.394
Chain G								-



**Figure S1. Sequence alignment of several LarE proteins.** Amino acid sequence alignment of several LarE proteins (*MmLarE*, *Thermotoga maritima*, WP\_004080596.1; *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*, WP\_094046537.1; *Clostridium homopropionicum*, WP\_175478652.1; *Staphylococcus epidermidis*, WP\_038812312.1; *Enterococcus faecalis*, WP\_033597706.1; *Bacilli bacterium*, genbank PZD88032.1, LpLarE) was performed with CLUSTAL Omega (Sievers et al. 2011) and rendered with ESPript (Gouet et al. 1999). The secondary structure elements of MmLarE and LpLarE, which have been structurally characterized, are shown at the top and bottom of the alignment, respectively. The cysteines of MmLarE involved in iron-sulfur cluster coordination are shown as blue dots, above the alignment whereas the sacrificial cysteine of LpLarE is shown as a magenta dot, below the alignment.

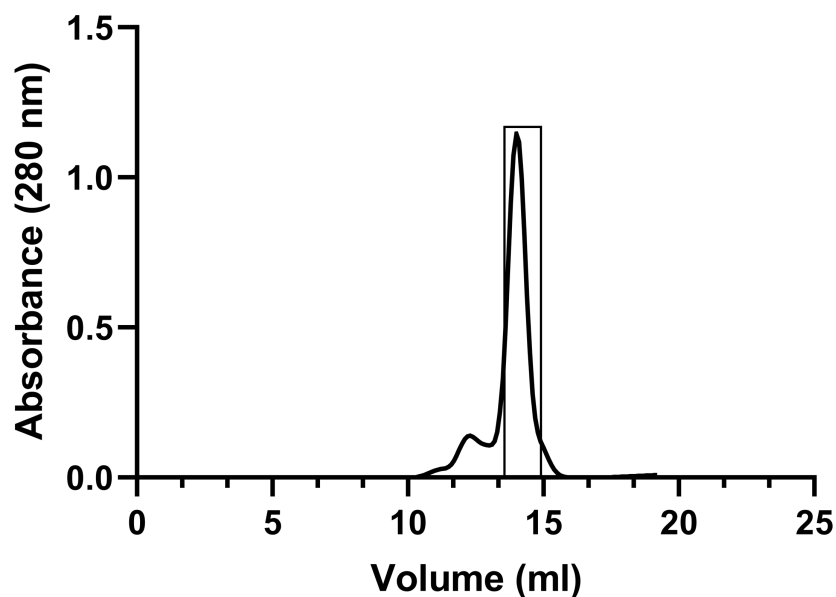


**Figure S2. Purification of apo-MmLarE.** **A** Nickel affinity chromatography of 'as-purified' MmLarE. The absorbance at 280 nm and 410 nm are shown as full and dashed lines, respectively. **B** Purification of 'as-purified' MmLarE by size exclusion chromatography on a Superdex 75 gel 16/60 filtration column. **C** 14 % SDS PAGE gel of 'as-purified' MmLarE (1) and holo-MmLarE (2).

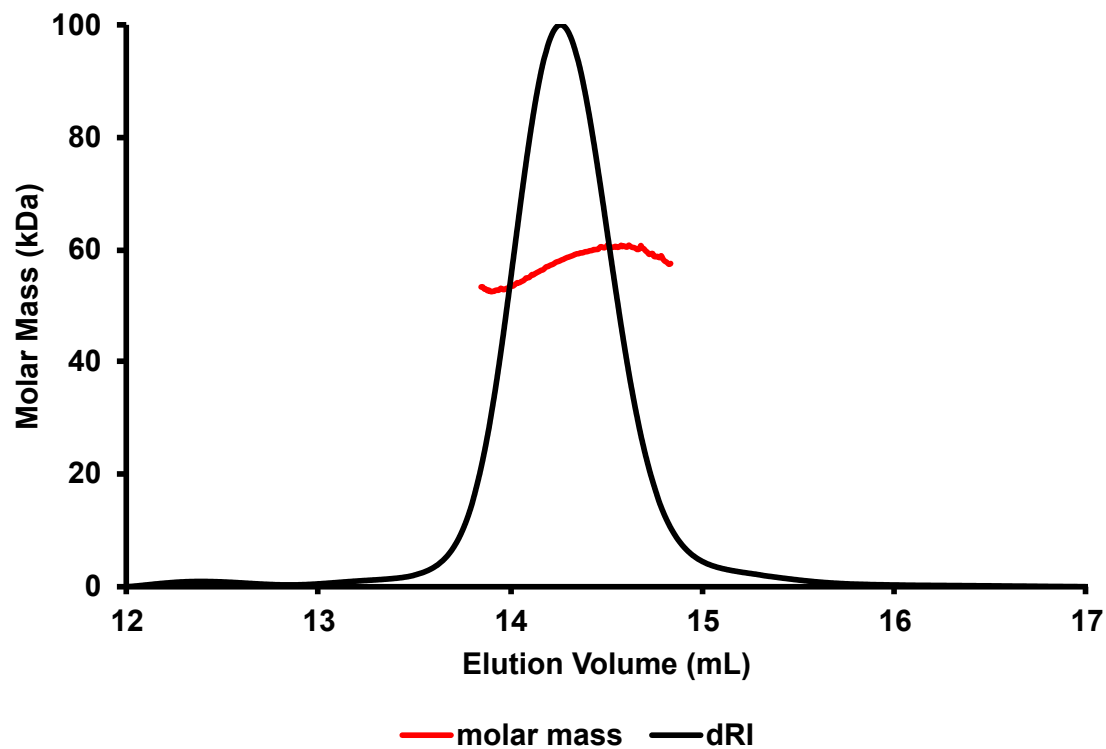


**Figure S3. Purification and determination of molar mass of holo-MmLarE.** **A** Purification of holo-MmLarE by size exclusion chromatography on a Superdex 200 gel filtration column. **B** SEC-MALS analysis of holo-MmLarE. dRI is the differential refractive index.

**A**



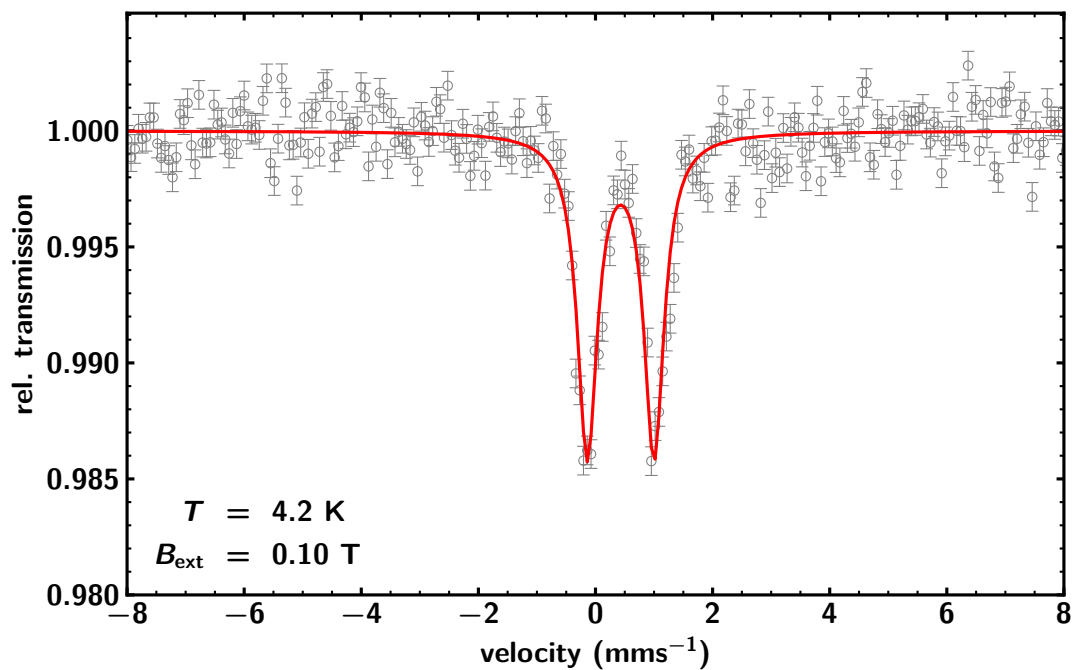
**B**



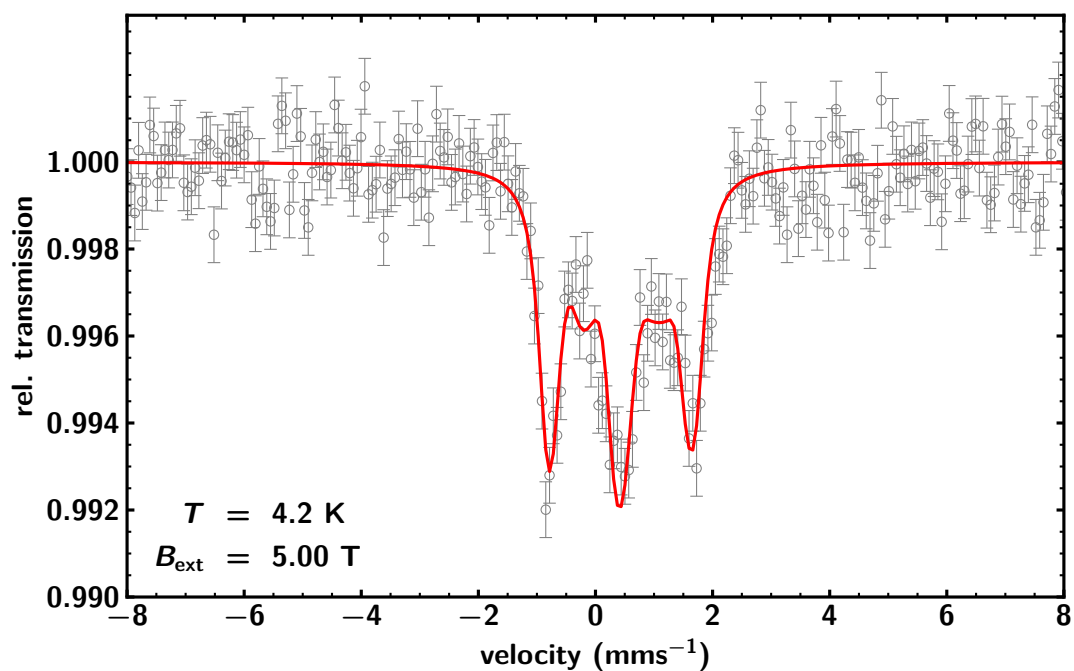


**Figure S4. Mössbauer spectra of holo-MmLarE (540  $\mu$ M) in 50 mM TRIS-HCl pH 8.5, 180 mM NaCl, 5 mM DTT. A.  $T=4.2$ K,  $B_{\text{ext}}=0.1$ T. B  $T=4.2$ K,  $B_{\text{ext}}=5$ T. Solid lines are simulations with the parameters given in Table S1.**

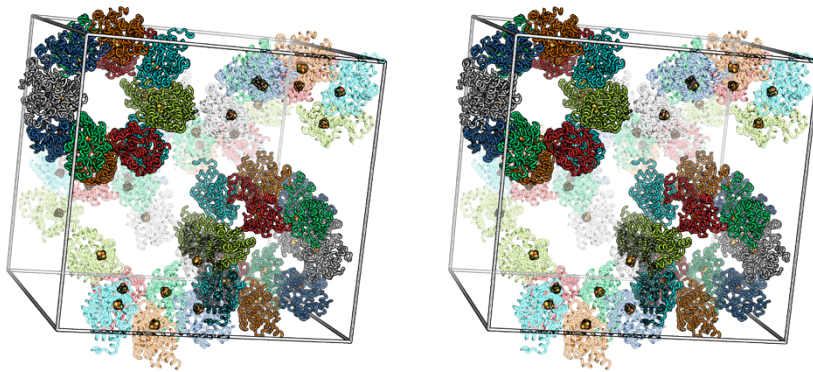
**A**



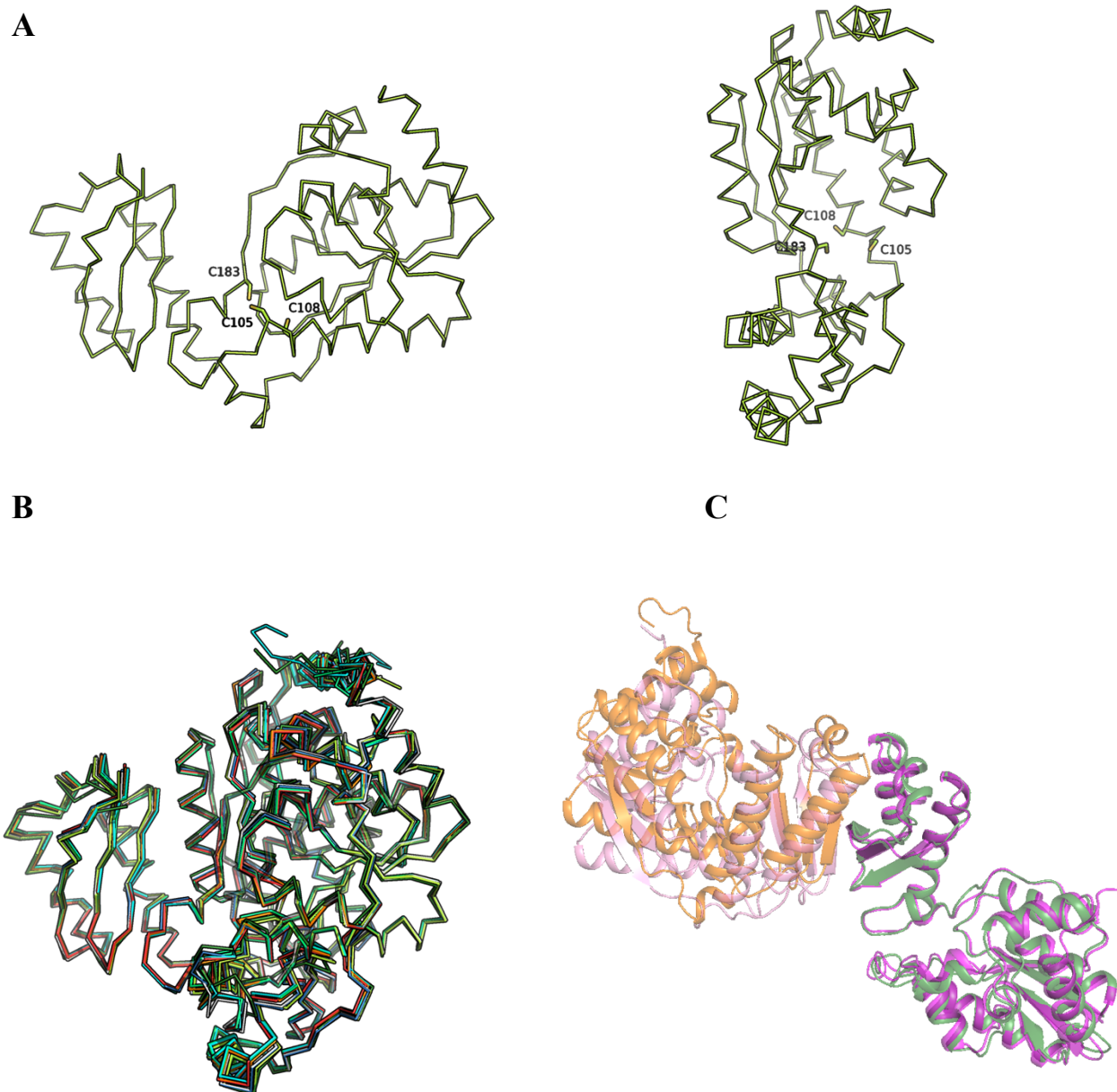
**B**



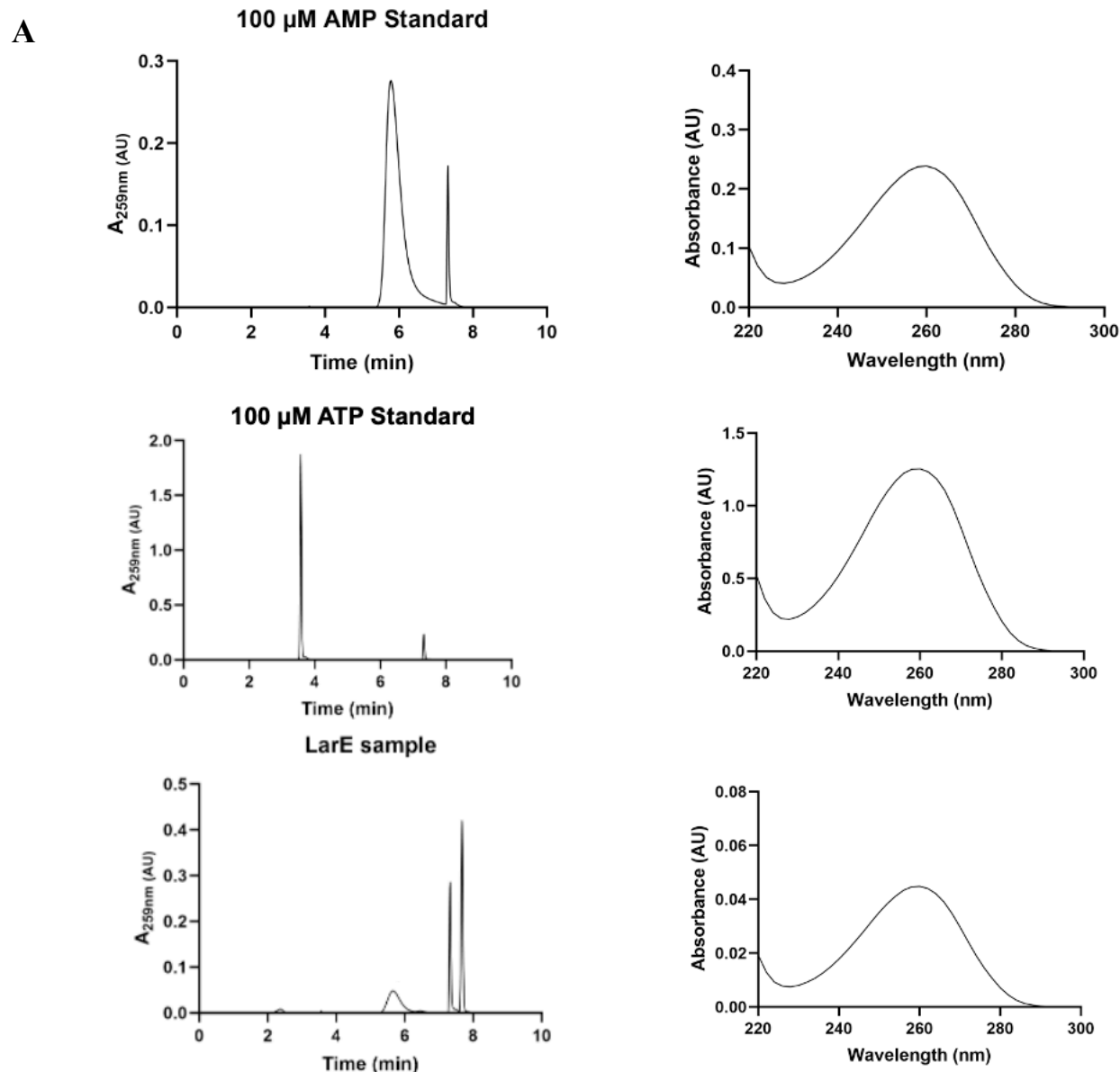
**Figure S5: Stereo view of the crystal packing of holo-MmLarE involving heptamers of dimers.**



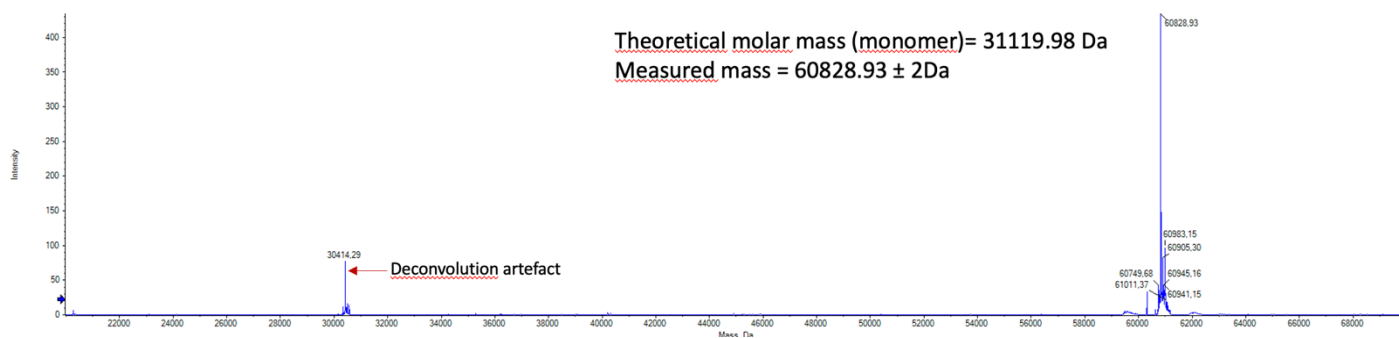
**Figure S6. Comparison of the holo-MmLarE crystal structure and the AlphaFold model.** **A** AlphaFold model in two orthogonal views, with the conserved cysteines in stick representation. **B** Same views of the superposition of the seven molecules in the asymmetric unit of holo-MmLarE with the AlphaFold model. The colors of the monomers are limon (A), tv\_red (B), limegreen (C), cyan (D), orange (E), white (F), skyblue (G), forest (AlphaFold). **C** Comparison of the dimers of the holo-MmLarE crystal structure (in green and orange) and AlphaFold model (in magenta and pink) after superposition of one monomer (in green and magenta).



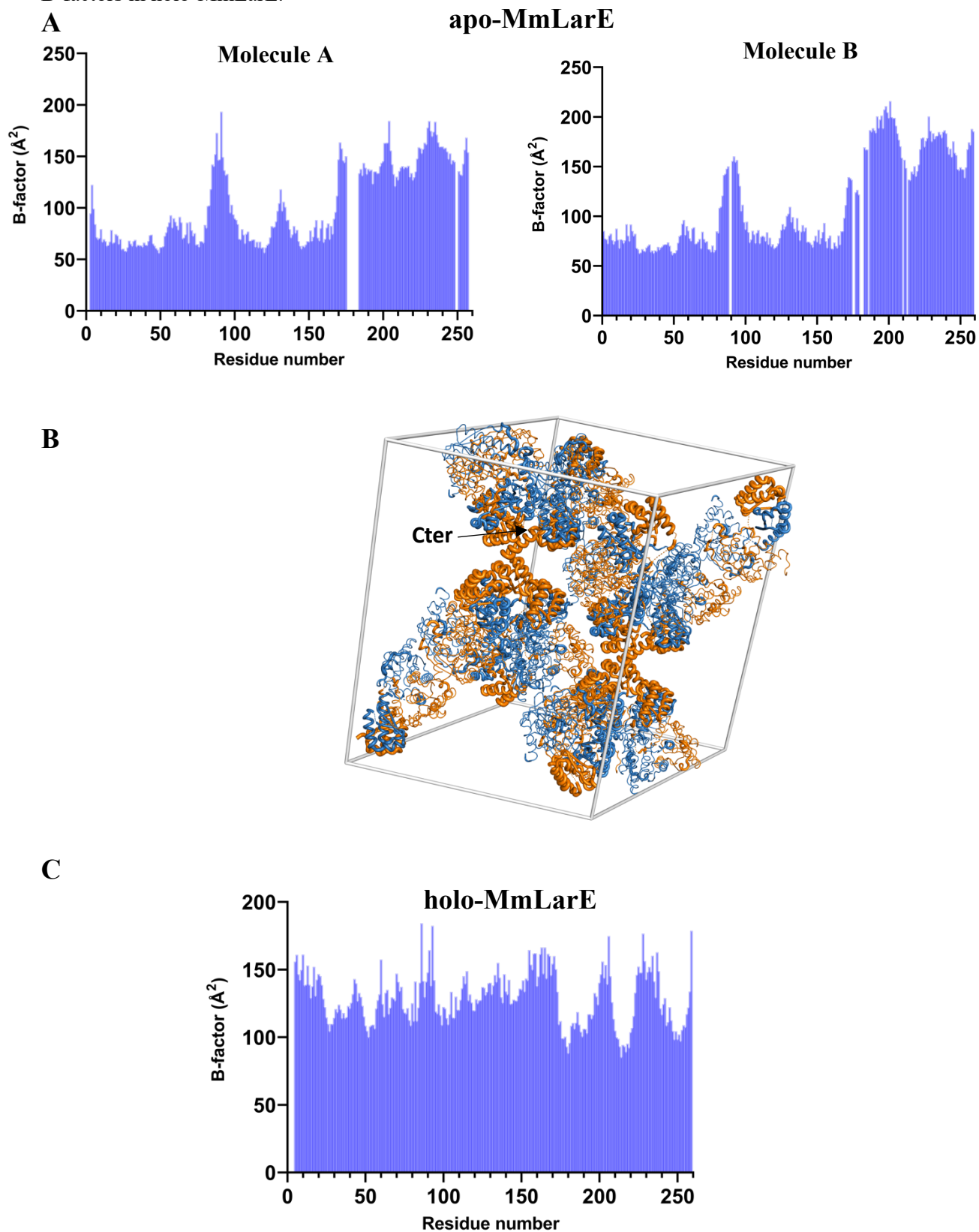
**Figure S7: Analysis of small molecule content in as-purified MmLarE.** **A** Reversed-phase HPLC analysis of nucleotide co-purified with MmLarE. Top: AMP standard, middle: ATP standard, bottom: LarE sample. The HPLC chromatogram is shown on the left and the absorption spectrum on the right. **B** Nano-LC-MS analysis of ‘as-purified’ MmLarE in 50 mM Tris pH 8.5, 300 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol. The deconvoluted spectrum is shown.



**B**

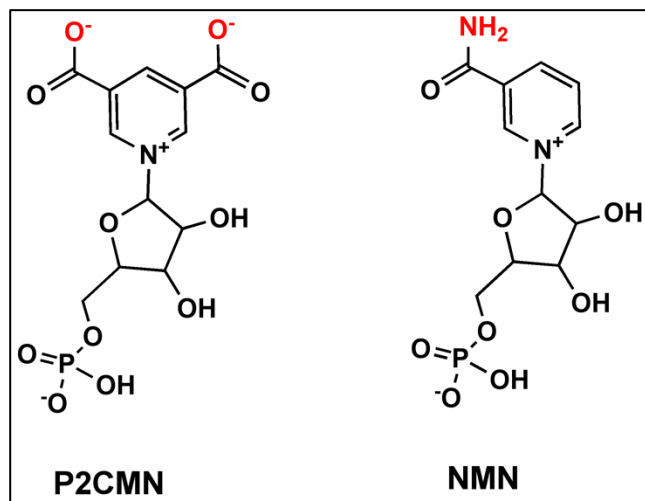


**Figure S8: Thermal motions in the apo-MmLarE and holo-MmLarE crystal structures.** **A** Comparison of the B-factors for the two molecules in apo-MmLarE. **B** Crystal packing of apo-MmLarE, with the B-factors in putty representation, the radius being proportional to the B-factor (chain A in blue and chain B in orange). The C-terminus of chain B is indicated by an arrow. The higher disorder in the C-terminal domains, compared to the N-terminal domains, is clearly shown by the increased radius. **C** B-factors in holo-MmLarE.

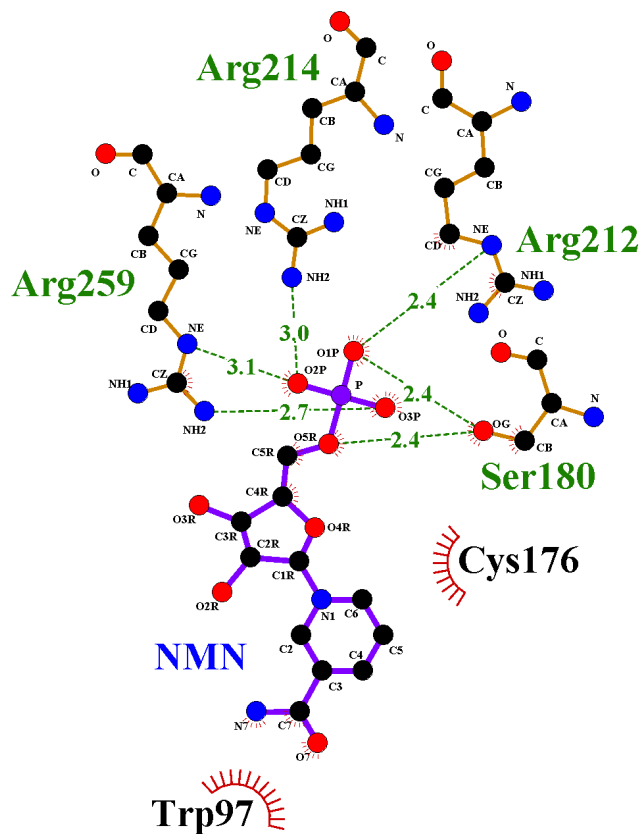


**Figure S9: Structure of LpLarE bound to NMN.** **A** Comparison of the structures of the P2CMN substrate and NMN. **B** LigPlot analysis of NMN bound to LpLarE (PDB code 5UDR, molecule A).

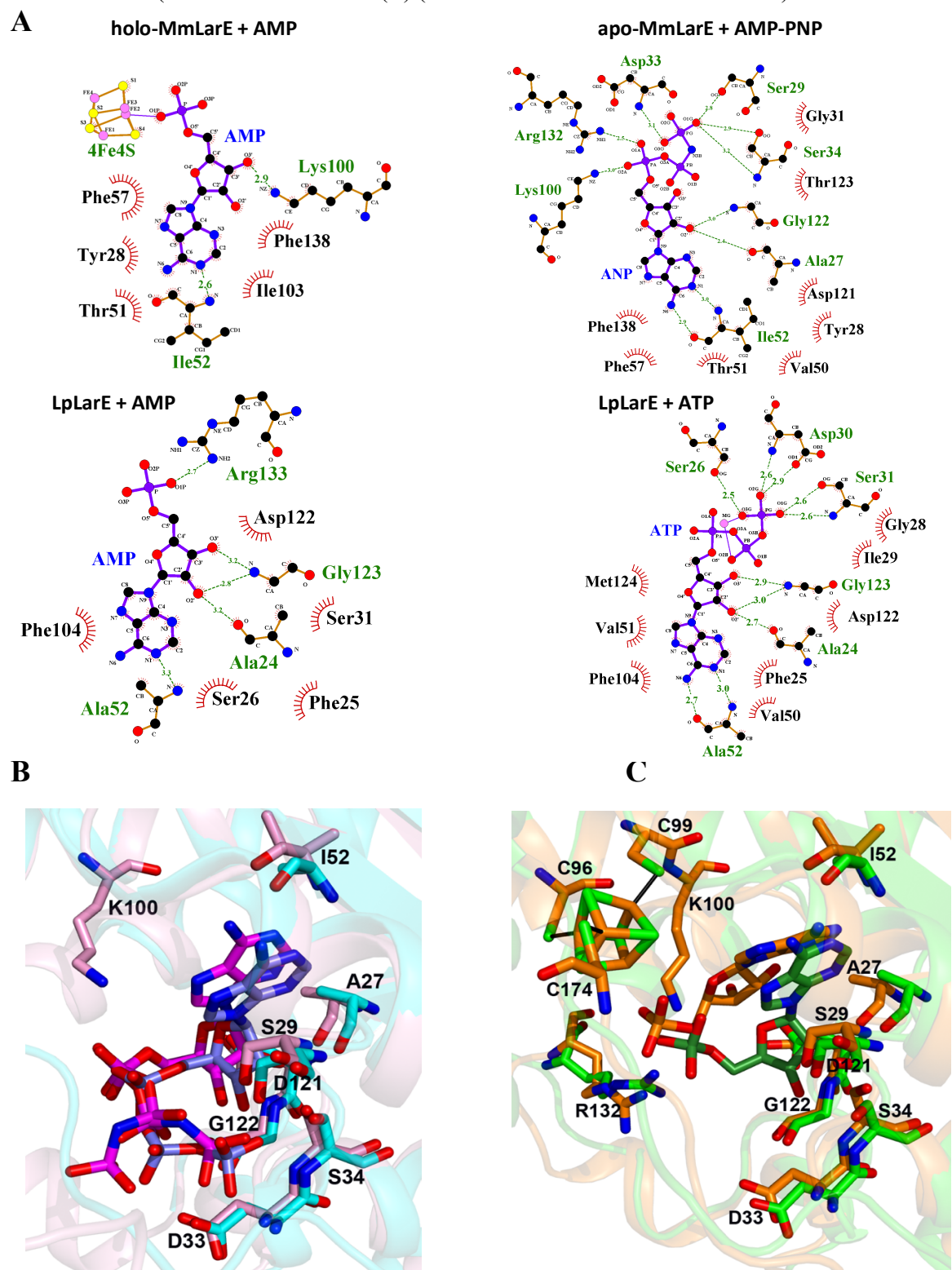
**A**



**B**

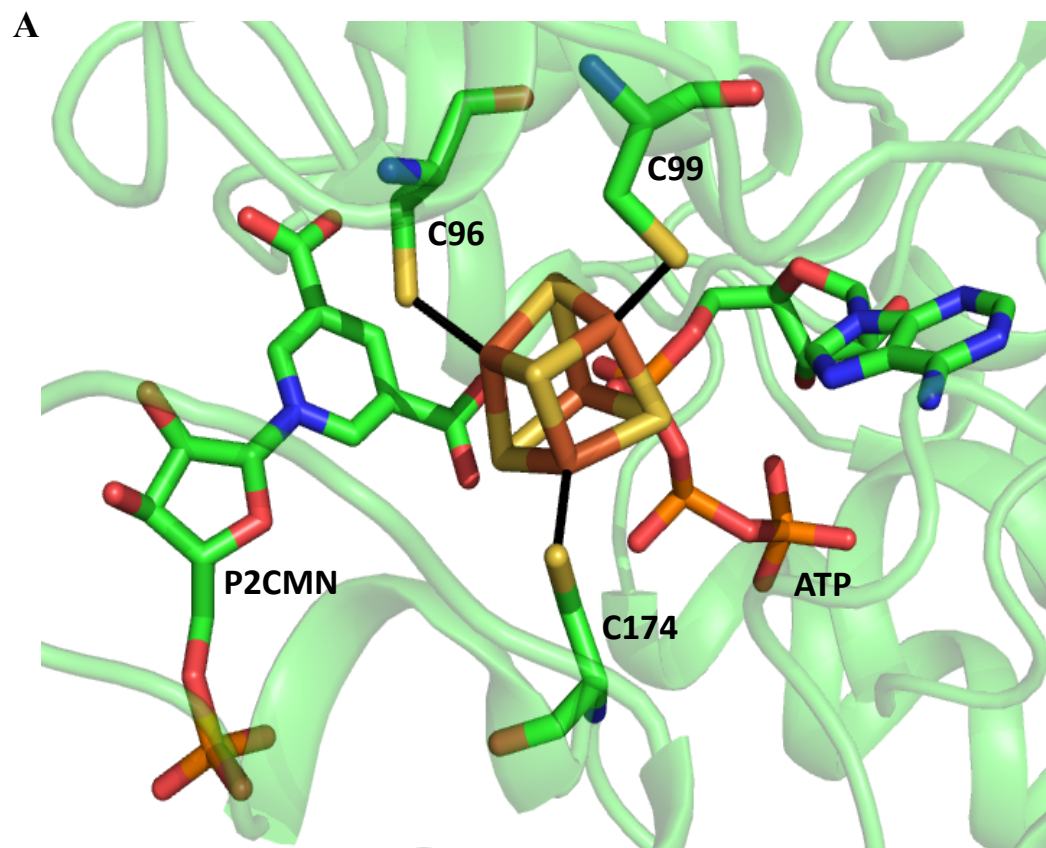


**Figure S10:** Comparison of the nucleotide binding sites of MmLarE and LpLarE. **A** LigPlot analysis of the residues involved in binding AMP in holo-MmLarE (chain A), AMP-PNP in apo-MmLarE (chain A), ATP in LpLarE (PDB code 5UDS, chain A) and AMP in LpLarE (PDB code 5UDT, chain A). The loop containing Arg133 is disordered in the LpLarE/ATP complex. **B** Superposition of the active site structures of apo-MmLarE bound to AMP-PNP and LpLarE bound to ATP (RMSD of 1.64 Å over 157 C $\alpha$  atoms). **C** Superposition of the active site structures of holo-MmLarE bound to AMP and LpLarE bound to AMP (same orientation as in **B**) (RMSD of 1.75 Å over 226 C $\alpha$  atoms).



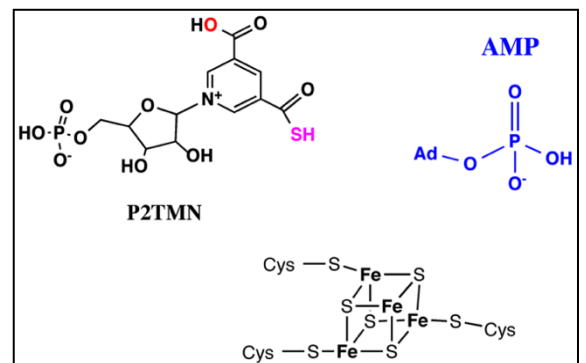
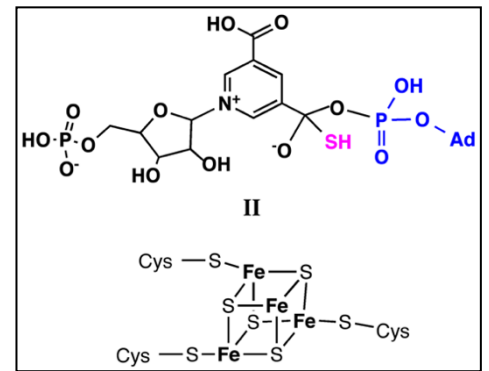
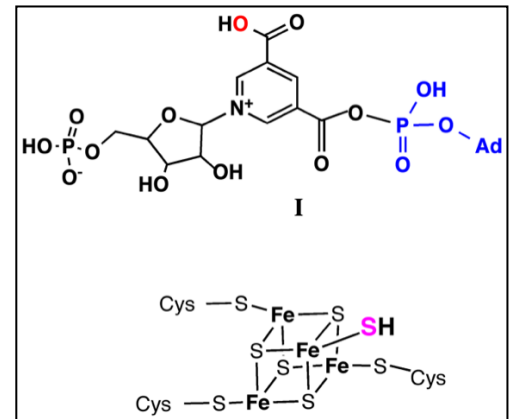
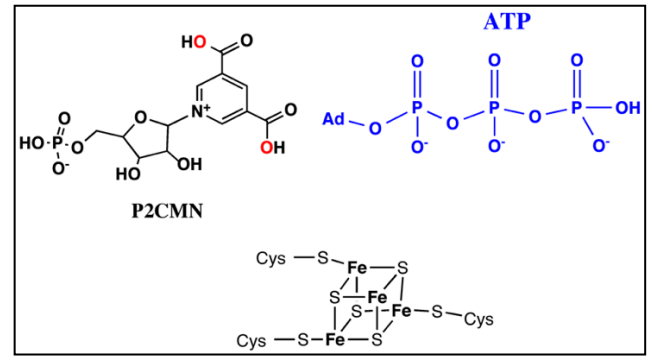
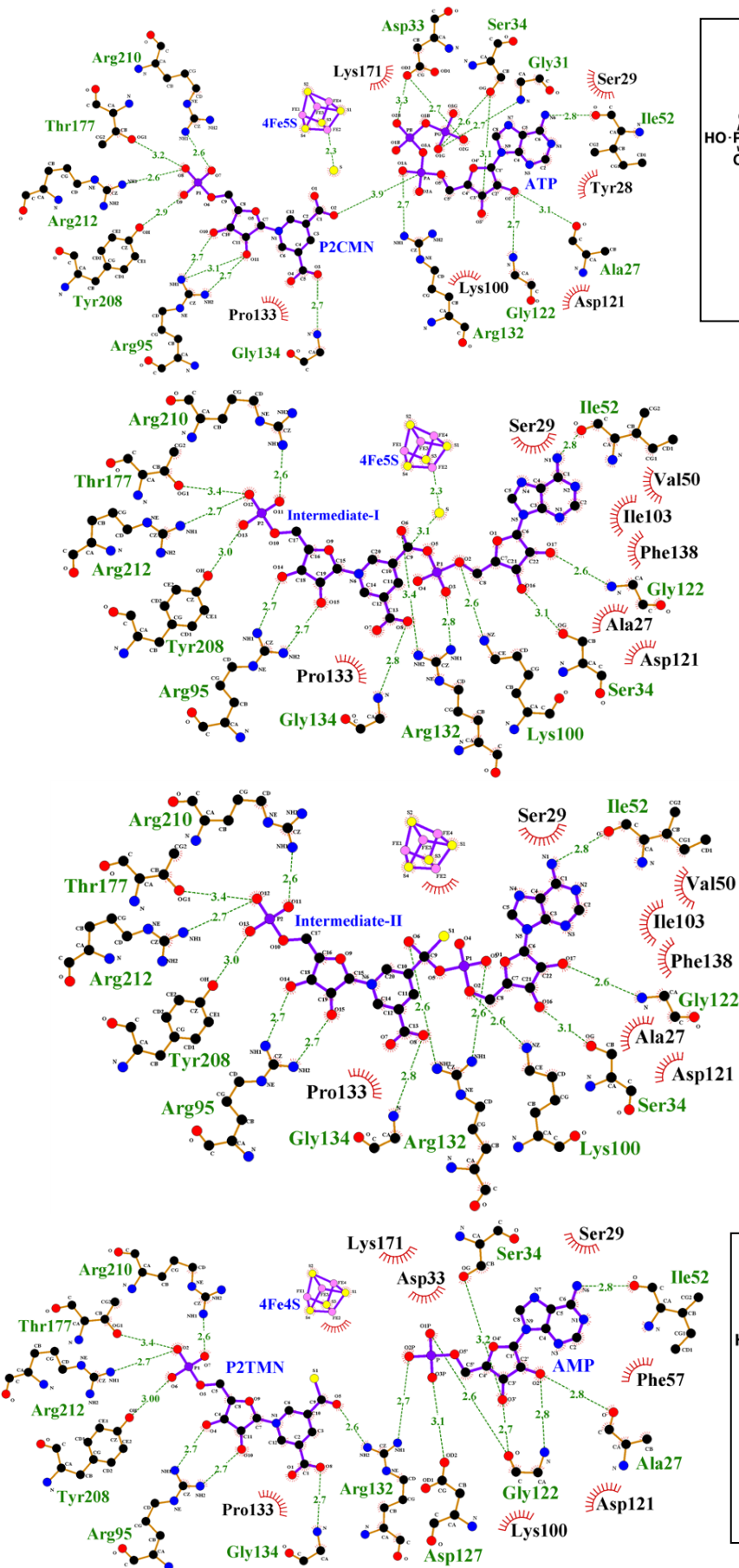


**Figure S11. Models of the main catalytic intermediates along the MmLarE-catalyzed-reaction.** See Material and Methods for details about the modeling. **A** Model of holo-MmLarE in complex with ATP and P2CMN based on the superposition of the crystal structures, as depicted in Figure 7B. **B** LigPlot analysis of the manual models of the main intermediates along the first sulfur insertion reaction catalyzed by MmLarE (see Figure 7A).

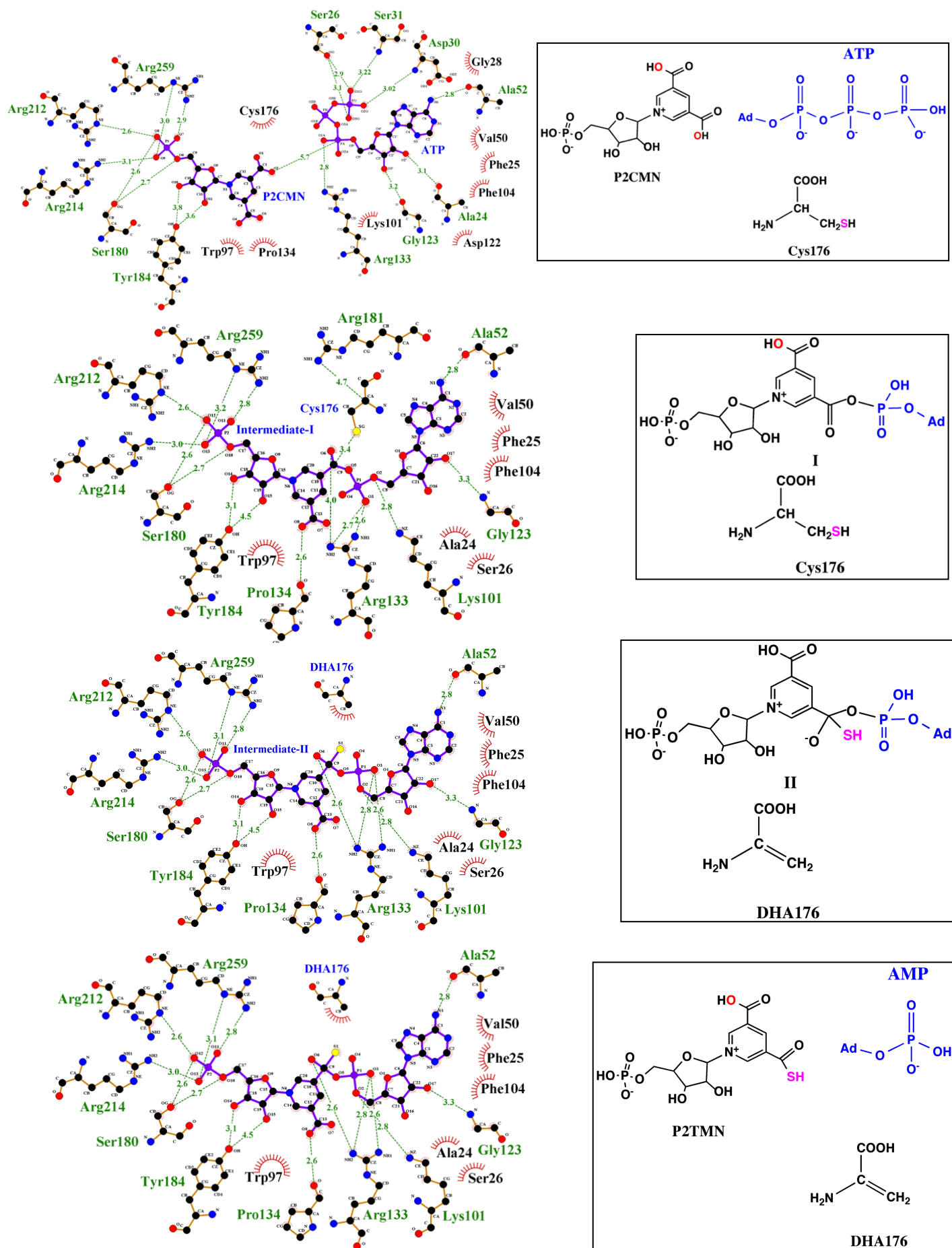




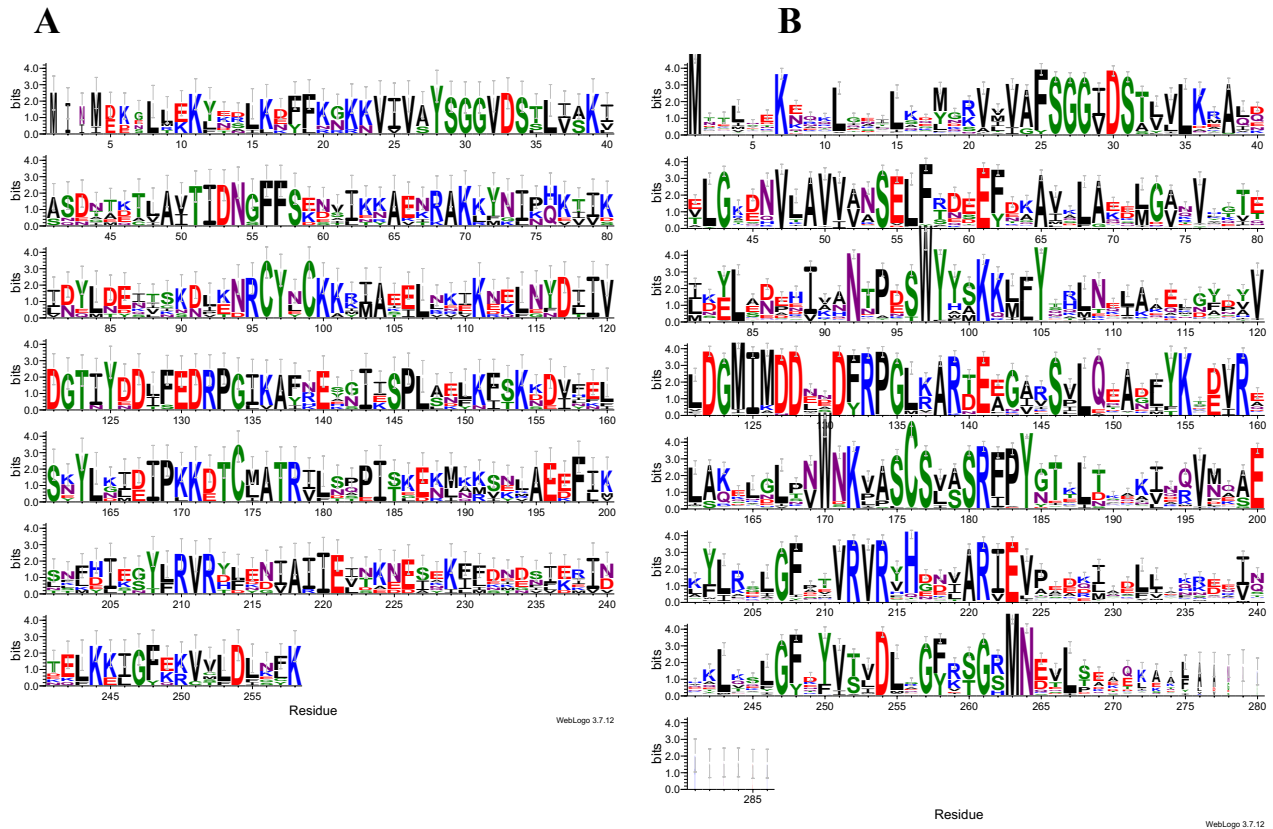
**B**



**Figure S12.** LigPlot analysis of models of the main intermediates along the sulfur insertion reaction catalyzed by LpLarE. The models have been generated based on the crystal structures, as described for the MmLarE intermediates in Material and Methods. DHA stands for ‘dehydroalanine’.



**Figure S13.** Comparison of the residues conservation between MmLarE (A) and LpLarE (B). The mmseq2 alignment obtained with Colabfold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2>) was filtered with HHHFilter (Gabler et al. 2020) using the following parameters: Min Id: 50% Min Cov 65% Max Id 95%. The resulting alignment was rendered with WebLogo (Bogdan et al. 2001).



## References

- ~~Bogdan, J.A., Nazariolarrieu, J., Sarwar, J., Alexander, P., and Blake, M.S. 2001. *Bordetella pertussis* autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine. *Infect Immun* **69**: 6823.~~
- ~~Gabler, F., Nam, S.Z., Till, S., Mirdita, M., Steinegger, M., Söding, J., Lupas, A.N., and Alva, V. 2020. Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Curr Protoc Bioinformatics* **72**(1): e108.~~
- ~~Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**(4): 305-308.~~
- ~~Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J. et al. 2011. Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539.~~





**Projet 3 : Détermination de la masse molaire des protéines  
liant un centre [Fe-S] par chromatographie d'exclusion  
stérique couplée à la diffusion de lumière multi-angles  
(SEC-MALS).**

## I. Genèse du projet/Déroulement/Contribution

En raison des propriétés physico-chimiques particulières des clusters [Fe-S], décrites dans l'introduction de cette thèse (cf. Introduction section II), les protéines qui intègrent ces cofacteurs requièrent des précautions particulières lors de leur manipulation.

La propriété d'absorption de la lumière par les atomes de fer du cluster [Fe-S] nécessite une correction lors de la détermination de la masse molaire de ces protéines par SEC-MALS. La diffusion de lumière multi-angle (MALS), associée à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), permet de mesurer la masse molaire exacte et le rayon hydrodynamique de diverses biomolécules en solution [Wen, 1996]. Son utilisation permet aussi d'évaluer l'homogénéité des échantillons et de déterminer la stœchiométrie de complexes spécifiques, tels que les assemblages protéine-protéine ou protéine-ligand [Hardouin, 2018]. Toutefois, cette technique nécessite des corrections pour les protéines liant des clusters [Fe-S], dont les atomes de fer absorbent à la longueur d'onde du laser employé en SEC-MALS. Dans ce papier, la méthode de correction est appliquée à plusieurs protéines contenant des [2Fe-2S] et [4Fe-4S] mais elle pourrait l'être aussi à d'autres types de protéines qui interfèrent de manière similaire avec le laser.

### Contribution personnelle au projet

Ma contribution à ce projet a été de fournir les échantillons apo et holo des enzymes MmCyuA (cf. Projet 1) et MmLarE (cf. Projet 2).

### Discussion

La méthode de correction révèle une différence notable entre les masses molaires des holo-protéines calculées avec et sans cette correction (**Tableau 5**). Toutefois, pour LarE et CyuA, l'écart est relativement modeste, soit respectivement 2 % et 3 %, en comparaison avec l'écart de 80 % observé pour la 4-thiouridine désulfurase TudS [Zhou, 2021]. Cette différence pourrait par exemple dépendre du degré d'exposition des clusters [Fe-S] au solvant (**Tableau 5**).

La discussion souligne également l'importance d'une mesure précise de la masse moléculaire des protéines contenant des clusters [Fe-S], en raison de la potentielle implication de ces clusters sur l'état oligomérique des protéines. Par exemple, les protéines NEET, mitoNEET et CISD2 étudiées sont monomériques dans leur état apo mais adoptent une configuration dimérique dans leur état holo, ce qui suggère que leur cluster [2Fe-2S] joue un rôle important dans le processus de dimérisation. Ces modifications structurales sont par ailleurs essentielles pour la fonctionnalité de NEET.

**Tableau 5 :** Variations de la masse molaire expérimentalement déterminée par les méthodes LM (mode classique d'analyse des données) et FM (mode d'analyse des données prenant en compte l'absorption du laser par les atomes de fer des clusters [Fe-S] liés aux protéines).

Protein	Theoretical Molar Mass (kDa) <sup>1</sup>	Experimental Molar Mass						
		No Correction (kDa)	Oligomerization State <sup>1</sup>	LM <sup>2</sup> (kDa)	Mass Difference with Theoretical Value Using LM <sup>3</sup> (%)	FM <sup>2</sup> (kDa)	Mass Difference with Theoretical Value Using FM (%) <sup>3</sup>	
mitoNEET	8.6 (M); 17.2 (D)	Apo	9.3	M	9.3	-8.1	9.3	-8.1
		Holo	16.2	D	16.2	5.8	18.8	9.3
CISD2	11.4 (M); 22.8 (D)	Apo	11.8	M	11.9	-4.4	12.6	-10.5
		Holo	19	D	19	16.7	20.9	8.3
MnmA	40.6 (M)	Apo	36.3	M <sup>4</sup>	36.3	10.6	36.3	10.6
		Holo	36.1	M	36.5	10.1	40.1	1.2
LarE	31.1 (M); 62.2 (D)	Apo	54.1	D	54.2	12.9	54.2	12.9
		Holo	58.8	D	58.8	5.5	60.5	2.7
CyuA	43.7 (M); 87.4 (D)	Apo	77.9	D	77.9	10.9	78.6	10.1
		Holo	78.9	D	78.9	9.7	80.8	7.6
TudS	16.5 (M)	Holo	4.5	M	3.3	80.0	17.9	-8.5

<sup>1</sup> : M monomère ; D, dimère. <sup>2</sup> : Masse molaire évaluée soit via le mode Laser Monitor (LM - mode classique), soit par le mode Forward Monitor (FM - corrigeant les effets d'absorption des échantillons).

<sup>3</sup> : voir Article (Table 1)



## **II. Article 3**

## Article

# Determination of the Absolute Molar Mass of [Fe-S]-Containing Proteins Using Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS)

Christophe Velours<sup>1,2,\*</sup>, Jingjing Zhou<sup>3,†</sup>, Paolo Zecchin<sup>3,†</sup>, Nisha He<sup>3</sup>, Myriam Salameh<sup>4</sup>, Marie-Pierre Golinelli-Cohen<sup>4</sup>  and Béatrice Golinelli-Pimpaneau<sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Fundamental Microbiology and Pathogenicity Laboratory, UMR 5234 CNRS-University of Bordeaux, SFR TransBioMed, 33076 Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, UMR 8229 CNRS, Collège de France, Sorbonne Université, 11 Place Marcelin Berthelot, 75231 Paris, France; jingjing.zhou@college-de-france.fr (J.Z.); paolo.zecchin@college-de-france.fr (P.Z.); nshe1992@163.com (N.H.)

<sup>4</sup> Institut de Chimie des Substances Naturelles, Université Paris-Saclay, CNRS, UPR2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France; myriam.salameh@agroparistech.fr (M.S.); marie-pierre.golinelli@cnrs.fr (M.-P.G.-C.)

\* Correspondence: christophe.velours@u-bordeaux.fr (C.V.); beatrice.golinelli@college-de-france.fr (B.G.-P.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Velours, C.; Zhou, J.; Zecchin, P.; He, N.; Salameh, M.; Golinelli-Cohen, M.-P.; Golinelli-Pimpaneau, B. Determination of the Absolute Molar Mass of [Fe-S]-Containing Proteins Using Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *Biomolecules* **2022**, *12*, 270. <https://doi.org/10.3390/biom12020270>

Academic Editor: Elzbieta Skrzydlewska

Received: 21 December 2021

Accepted: 3 February 2022

Published: 8 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Size Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS) is a technique that determines the absolute molar mass (molecular weight) of macromolecules in solution, such as proteins or polymers, by detecting their light scattering intensity. Because SEC-MALS does not rely on the assumption of the globular state of the analyte and the calibration of standards, the molar mass can be obtained for proteins of any shape, as well as for intrinsically disordered proteins and aggregates. Yet, corrections need to be made for samples that absorb light at the wavelength of the MALS laser, such as iron-sulfur [Fe-S] cluster-containing proteins. We analyze several examples of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster-containing proteins, for which various corrections were applied to determine the absolute molar mass of both the apo- and holo-forms. Importantly, the determination of the absolute molar mass of the [2Fe-2S]-containing holo-NEET proteins allowed us to ascertain a change in the oligomerization state upon cluster binding and, thus, to highlight one essential function of the cluster.

**Keywords:** SEC-MALS; size exclusion chromatography; multi-angle light scattering; molar mass; molecular weight; Fe-S cluster; iron-sulfur cluster; [Fe-S]-binding protein; NEET protein

## 1. Introduction

Determining the molar mass (or molecular weight) is a critical step in the biophysical characterization of a newly produced protein. Analytical size-exclusion chromatography (SEC) is commonly used for the determination of the molar mass of proteins and protein-protein complexes in solution, based on the elution volume and a calibration curve based on protein standards [1]. However, when the protein is not globular or undergoes non-ideal column interactions, such determined molar mass is incorrect. In contrast, Multi-Angle Light Scattering (MALS) is an absolute technique that uses a collimated beam from a laser source to determine the exact mass in solution of proteins, lipids, detergents, nucleic acids, sugars or heterologous complexes and to evaluate their gyration radius [2–5]. The combination of SEC for separating proteins by their hydrodynamic radius, with MALS for determining the molar mass of the eluted protein, constitutes a versatile, reliable means for characterizing solutions of one or more protein species. Moreover, SEC-MALS, in which the measurement is performed at each elution volume, can determine if an eluting

peak is homogeneous or heterogeneous and distinguish between a fixed molecular weight distribution versus a dynamic equilibrium [6,7]. Finally, this method enables the calculation of the stoichiometry of complexes such as protein–protein [6,8,9] or protein–carbohydrate complexes [10]. However, corrections of the light scattering measurements are required to determine the molar mass of polymers that are fluorescent or that absorb light at the operating laser wavelength. Whereas such corrections were previously described for lignin polymers [11], this topic is not frequently discussed in the literature. Thus, we address the case of iron–sulfur [Fe-S] cluster-containing proteins, which absorb light at the laser wavelength.

[Fe-S] clusters are among the oldest cofactors present in both aerobic and anaerobic organisms [12]. They are formed by ferrous and ferric ions bridged by sulfide ions. The most current forms are the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters [13], but more complex assemblies exist [14,15]. [Fe-S] clusters, typically coordinated by four cysteines, are known for their capacity to accept and give electrons, as exemplified by complex I of NADH quinone oxidoreductase [16]. The intrinsic chemistry of [Fe-S] clusters allows them to serve as sensors of gaseous (oxygen or NO) or nongaseous molecules (reactive oxygen species or ROS), or as a sensor of the Fe and [Fe-S] cluster content in the cell [17,18]. Numerous [Fe-S] proteins are also involved in regulating genetic expression [19,20]. For example, fumarate and nitrate reductase (FNR) is an interesting case of a transcription regulator, for which the oligomerization state of the protein changes with the chemical nature of the cluster [21,22]. Indeed, in the absence of O<sub>2</sub>, FNR contains a [4Fe-4S] cluster, which allows the dimerization of the protein, specific binding of the protein to DNA and transcription. Yet, in the presence of O<sub>2</sub>, the [4Fe-4S] cluster is rapidly converted into a [2Fe-2S] form, leading to the dissociation of the dimer and inactivation of FNR. Finally, some [Fe-S] proteins are enzymes, in which the [4Fe-4S] cluster serves as a cofactor to catalyze a chemical reaction [23], such as aconitase that catalyzes the dehydration of citrate [24,25].

Here we investigate [2Fe-2S]-containing regulatory proteins and [4Fe-4S]-dependent sulfuration and desulfidase enzymes. On the one hand, human CISD2 and mitoNEET are two mammalian NEET proteins anchored in the endoplasmic reticulum and mitochondria membranes, respectively, that possess [Fe-S]-containing cytosolic domains that are very close in sequence and structure [26]. This recently discovered class of [2Fe-2S]-proteins are characterized by atypical cluster coordination involving one histidine and three cysteines. Several studies have demonstrated their involvement in the regulation of iron and ROS homeostasis in cells [27]. One of their remarkable properties is their ability to transfer their cluster to a recipient protein under the strict control of the redox state of their cluster [28] and to be able to sense their environment [29]. On the other hand, sulfuration enzymes and desulfidases are [4Fe-4S]-dependent enzymes. tRNA sulfuration enzymes are involved in the biosynthesis of sulfur-containing nucleosides, which are essential for the efficiency and accuracy of genetic translation [30–33], whereas LarE catalyzes sulfur insertion in the cofactor of lactate racemase [34], TudS is a recently discovered thiouracil desulfidase [35] and CyuA is a cysteine desulfidase [36]. In the case of these sulfurases and desulfidases, the [4Fe-4S] cluster is bound by three ligands only, and the fourth non-protein bonded unique iron is presumed to bind and activate the sulfur donor for the sulfuration reaction [30,31] or the sulfur of the substrate for the desulfuration reaction [35].

The determination of the absolute molar mass is an important step, not only for the characterization of these [Fe-S]-binding proteins but also to reveal the potential involvement of the iron–sulfur cluster in protein oligomerization. In SEC-MALS, the SEC column is used solely to separate the various species according to their hydrodynamic radius so that they enter the MALS and concentration detector devices individually, the actual retention time not being significant for the analysis. The calibration of the instruments is independent on the column and does not rely on reference standards. Hence, SEC-MALS is considered an ‘absolute’ method to determine the molar mass from basic equations, using the ratio of the scattered and incident light intensities at several angles and the sample concentration determined by the refractive index (RI) detector. We detail here a correction method for

analysis of SEC-MALS data of several [2Fe-2S]- and [4Fe-4S]-containing proteins, collected with the mini-DAWN TREOS Wyatt devices, that can be applied to any [Fe-S]-containing protein and, more widely, to any protein that absorbs at the laser wavelength. We show that the molar mass of the holo-proteins can be determined more accurately than without the correction and that, in the case of two NEET proteins, the binding of the cluster triggers the dimerization of the proteins.

## 2. Materials and Methods

Purification of human CISD2, *Escherichia coli* MnmA, *Aeromonas* TudS and human mitoNEET has been described previously [26,32,35,37], whereas the overexpression and purification of LarE and CyuA from *Methanococcus maripaludis* will be reported elsewhere (unpublished results). MitoNEET and CISD2 were purified aerobically as holo-proteins, whereas chemical cluster reconstitution was performed anaerobically with the as-purified proteins (mixture of apo/holo forms) of MnmA, TudS, LarE and CyuA, as described previously [32]. After anaerobic purification, these latter holo-proteins with labile [Fe-S] clusters were frozen and kept in air-free sealed tubes.

The as-purified MnmA, CyuA and LarE proteins contained such a low amount of cluster (<5%) that they were used as the apo-proteins. To obtain the apo-proteins of the NEET proteins, the cluster was removed by incubation of the holo-proteins in the presence of 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 10 mM dithiothreitol (DTT) until the complete disappearance of the protein color and absorbance in the 320–600 nm range. Attempts to obtain the apo-form of TudS led to the aggregation of the protein.

As a final step of purification, all proteins were loaded on a gel filtration column (Hiload 26/60 Superdex 75 (Cytiva, Marlborough, MA) for NEET proteins, Hiload 26/60 Superdex 200 (Cytiva) for all other proteins equilibrated with the same buffer as used for SEC-MALS analysis; the major eluted peak was collected. Including DTT at a high concentration in the final chromatographic step of the apo-proteins is essential to avoid the formation of intermolecular disulfide bonds between solvent-exposed cysteines.

Proteins were then analyzed with two different types of SEC-MALS/UV/RI light scattering equipment with very similar components: high pressure liquid chromatography (HPLC) from Agilent (Santa Clara, CA, USA) or Shimadzu (Tokyo, Japan), mini-DAWN TREOS and refractometer (Optilab T-rEX or Optilab), all from Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, USA). For each sample, 100  $\mu\text{L}$  at  $\sim 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  was injected on the HPLC system equipped with a Superdex 200 increase 10/300 GL column (Cytiva), at a flow rate of  $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  in 50 mM sodium phosphate pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM DTT (for the [2Fe-2S] proteins) or 25 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT (for the [4Fe-4S] proteins). The protein concentration was determined using an average refractive index increment ( $dn/dc$ ) of  $0.183 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  at the laser wavelength (658 nm), in the 0.18–0.19 range used in classical buffers [38]. The light scattering detector was calibrated with toluene. The detector was controlled and the data were analyzed using the ASTRA 7.3 software (Wyatt Technology).

## 3. Theoretical Background

### 3.1. SEC-MALS Experiment

After separation of the species constituting the purified protein by HPLC on a SEC-column and illumination by a laser with an incident intensity  $I_0$  at a wavelength  $\lambda_0$  of 658 nm, the scattered light  $I_\theta$  was recorded at three different angles. By measuring the excess Rayleigh ratio  $R_\theta$  (the ratio of the scattered and incident light intensities at one measured angle  $\theta$ ), the concentration  $c$  by refractometry and adjusting the refractive index increment  $dn/dc$ , an absolute molar mass  $M$  could be obtained using Equation (1) [2,39]. This measurement is independent of the hydrodynamic radius of the macromolecule.

$$R_\theta = K^* M c P(\theta) [1 - 2A_2 M P(\theta) c] \text{ with } K^* = 4\pi^2 (dn/dc)^2 \frac{n_0^2}{N_a \lambda_0^4} \quad (1)$$

with  $P(\theta)$ , a corrective shape factor for big particles/molecules with respect to the laser wavelength [39],

$$1/P(\theta) = 1 + q^2 \frac{R_G^2}{3} \quad (2)$$

where  $R_G$  is the gyration radius of the particle and  $q$  is the scattering vector given by [39],

$$q = 4\pi n_0 \sin(\theta/2) / \lambda_0 \quad (3)$$

$A_2$  is the second virial coefficient that is a corrective factor for a non-ideal solution and which accounts for the interaction between two particles/molecules,  $n_0$ , the refractive index of the solvent and  $N_a$  the Avogadro number. In the case of online SEC-MALS, the  $2A_2MP(\theta)c$  term in Equation (1) is negligible, the orders of magnitude of  $A_2$ ,  $M$  and  $c$  being  $10^{-4}$ ,  $10^5$  and  $10^{-3}$ , respectively. Using Equations (2) and (3), Equation (1) becomes:

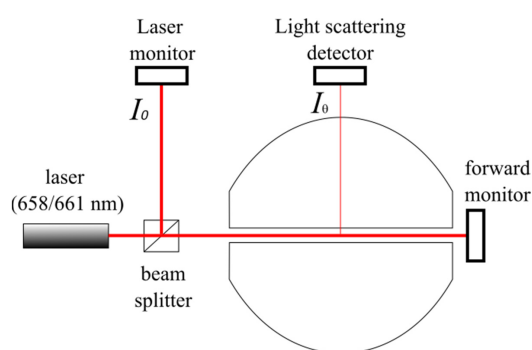
$$K^*c/R_\theta = \frac{1}{M} [1 + (16 \pi^2 n_0^2 R_G^2 \sin^2(\theta/2))] / 3 \lambda_0^2 \quad (4)$$

Experiments at several angles enable us to determine the molar mass,  $1/M$  being the  $y$ -intercept of the Zimm plot  $K^*c/R_\theta = f(\sin^2(\theta/2))$ . A weighted linear fit of the data requires a minimum of three detectors covering a sufficient angular range.

Concretely, in the mini-DAWN TREOS system, the intensity of scattered light  $I_\theta$  is measured by an array of photodiodes. The laser monitor measures the laser intensity  $I_0$  before it enters the flow cell, whereas the forward laser monitor measures the transmitted light through the flow cell and sample (Figure 1). The excess Rayleigh ratio  $R_\theta$  of scattered to incident light intensity needs to be corrected by the detector parameters (scattering volume  $V$  and distance of the scattering volume to the detector  $r$ ), according to Equation (5) [40].

$$R_\theta = \frac{I_\theta r^2}{I_0 V} \quad (5)$$

An accurate measurement of the laser intensity,  $I_0$ , is essential for the determination of the molar mass by SEC-MALS. In the case of macromolecules without chromophores, the variations of the intensity of the laser source due to power fluctuations are taken into account by dividing each photodiode signal by that of the laser monitor.



**Figure 1.** Schematic representation of the Mini-DAWN TREOS flow cell detectors (adapted from [40]).

### 3.2. Forward Monitor Correction Mode for Samples Absorbing at the Laser Wavelength

The Laser Monitor measures the intensity of the beam before it enters the cell, whereas the Forward Monitor measures the transmitted light through the flow cell and sample. This latter signal is used to determine the scattered intensity  $I_{corrected}$  of absorbing samples. According to the Beer–Lambert law, the optical attenuation of the beam  $F/F_0$  due to the absorbing sample, measured by the Forward Laser monitor, depends on the optical path length through the sample  $L$ , its concentration  $c$  and its extinction coefficient  $\epsilon$ .

$$-\log(F/F_0) = \epsilon Lc \quad (6)$$

The scattered intensity at the center of the sample ( $I_{corrected}$ ) is related to the intensity of the incident laser  $I_0$  by:

$$-\log(I_{corrected}/I_0) = \epsilon Lc/2 \quad (7)$$

Combining Equations (6) and (7) leads to:

$$I_{corrected} = I_0 \sqrt{F/F_0} \quad (8)$$

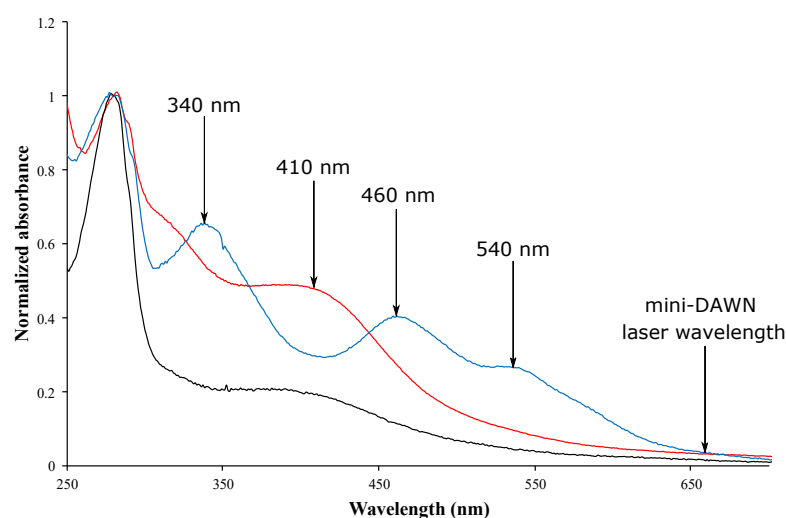
Practically, to correct the absorption of the laser light by the samples, the ASTRA experiment file is opened with the 'MALS TREOS Configuration' and the 'forward monitor' mode is selected from the 'Divide by Laser Monitor' drop-down menu. The scattered intensity of the protein  $I_\theta$  is obtained by subtracting the intensity scattered by the pure solvent from that of the total scattered intensity. This control is directly performed by the Astra software by subtracting the baseline ahead of the sample peak.

#### 4. Results

We analyzed by SEC-MALS six [Fe-S]-binding proteins, two [2Fe-2S] regulatory proteins (CISD2 and mitoNEET) and four [4Fe-4S]-dependent enzymes (TudS, LarE, MnmA and CyuA) to obtain their molar mass in solution. Both the holo- and apo-forms were investigated for each protein, except for TudS, whose apo-form could not be obtained.

##### 4.1. [Fe-S]-Binding Proteins Absorb at the Laser Wavelength

The absorption spectrum of [Fe-S]-binding proteins varies with the chemical nature of the cluster [41]. The apo-proteins absorb at 280 nm due to their aromatic amino acids but not in the visible light spectrum. In contrast, in addition to the peak at 280 nm, [4Fe-4S]-containing proteins exhibit a maximum of absorbance around 410 nm (Figure 2, red and black lines). The spectrum of [2Fe-2S]-containing proteins is more complex, with several characteristic absorption maxima between 320 and 430 nm, a peak around 470 nm and occasionally, a relatively broad peak between 550 and 600 nm (Figure 2, blue line). In both cases, the absorbance is not negligible at 658–661 nm, which corresponds to the laser wavelength.

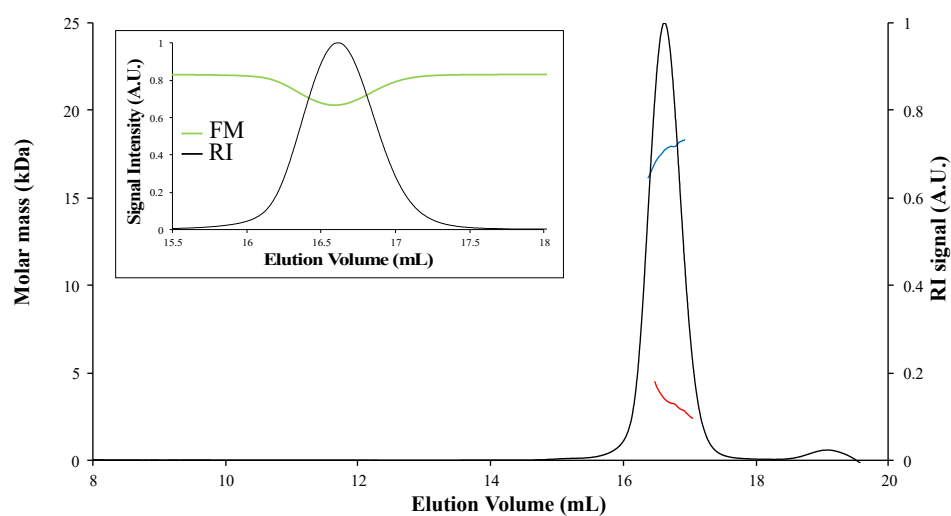


**Figure 2.** UV-visible absorbance spectra of the holo-forms of MnmA (black line), TudS (red line) and mitoNEET (blue line) between 250 and 700 nm. The absorption maxima for each holo-protein and the laser wavelength are indicated by arrows. Spectra were normalized using an absorbance value of 1 at 280 nm.

#### 4.2. Corrections for Samples Absorbing at the Laser Wavelength

Inaccurate molar masses are measured for macromolecules that absorb light at the laser wavelength (658/661 nm). In these cases, changes in measured intensity due to absorbance of the sample can be accounted for in the ASTRA software by dividing each photodiode signal by that of the forward laser monitor. Sample absorbance may be corrected by the procedure above if the forward monitor does not drop by more than approximately 20%. In addition, the effect of absorbance on the absolute molar mass determination can also be prevented by increasing the laser wavelength.

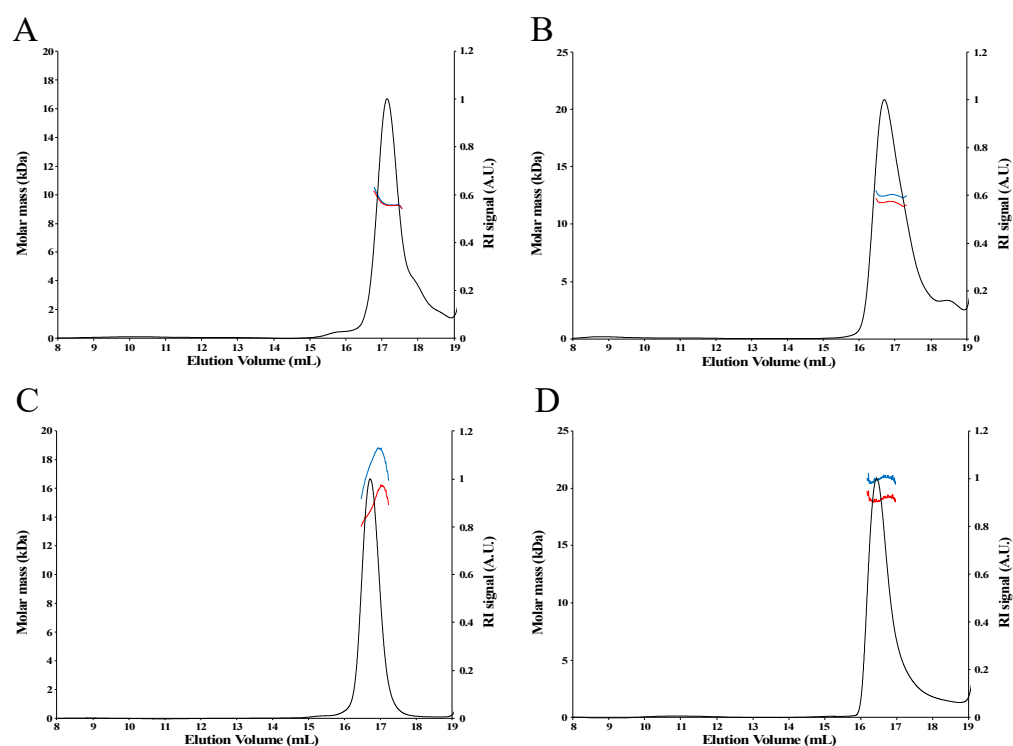
For all proteins, the SEC-MALS chromatograms did not reveal peaks of high molar mass corresponding to aggregates (Figures 3 and 4). In the presence of DTT, only one main peak was observed for the apo-proteins (Figure 4A,B and data not shown). For the holo-proteins, only one main peak was also observed, as exemplified in the case of holo-TudS (Figure 3) and the NEET proteins (Figure 4C,D), indicating no aggregation.



**Figure 3.** SEC-MALS analysis of holo-TudS. The molar mass was calculated using either the Forward Monitor (blue curve) or Laser Monitor correction modes (red curve). RI, refractive index; A.U., arbitrary unit. Insert: RI signal (black curve) and intensity signal of Forward Monitor detector (significant of protein absorbance; green curve), as a function of elution volume.

To calculate the molar mass of proteins from SEC-MALS data, one has to take into consideration the oligomerization state of the protein that is deduced by comparing the non-corrected experimental and theoretical molar mass values (Table 1). When analyzing the data of the studied apo-proteins that do not absorb light at the laser wavelength with the ASTRA software, the experimental molar masses determined without correction or using the Laser Monitor (LM) mode (normal mode for analysis of non-absorbing samples) correspond to the theoretical molar masses of the monomer or the dimer (Table 1). For the holo-proteins, the use of the Forward Monitor (FM) mode gives molar masses closer to the theoretical values than the LM mode, as shown by the significant variation in the experimentally determined molar mass, depending on whether the LM or FM modes were used. This difference was not observed with the apo-proteins, indicating that it originates from the presence of the [Fe-S] cluster and not from the protein sequence (Table 1). Therefore, the apo-proteins serve as a control (non-absorbing samples) for the validation of the method for correction of the absorbing samples. Regarding the holo-proteins, the variation of the molar mass calculated using LM or FM is exceptionally high for the TudS protein (80% decrease in molar mass compared to the theoretical value when LM is chosen) (Figure 3), significant for Cisd2 and MnmA (close to 10%), and relatively low for LarE and CyuA (2–3%).





**Figure 4.** SEC-MALS analysis of apo- and holo-NEET proteins using either the Forward Monitor (blue curve) or Laser Monitor (red curve) modes. (A) apo-mitoNEET. (B) apo-CISD2. (C) holo-mitoNEET. (D) holo-CISD2.

**Table 1.** Variation of the experimentally determined molar mass using the LM and FM modes.

Protein	Theoretical Molar Mass (kDa) <sup>1</sup>	Experimental Molar Mass						
		No Correction (kDa)	Oligomerization State <sup>1</sup>	LM <sup>2</sup> (kDa)	Mass Difference with Theoretical Value Using LM <sup>3</sup> (%)	FM <sup>2</sup> (kDa)	Mass Difference with Theoretical Value Using FM (%) <sup>3</sup>	
mitoNEET	8.6 (M); 17.2 (D)	Apo	9.3	M	9.3	−8.1	9.3	−8.1
		Holo	16.2	D	16.2	5.8	18.8	9.3
CISD2	11.4 (M); 22.8 (D)	Apo	11.8	M	11.9	−4.4	12.6	−10.5
		Holo	19	D	19	16.7	20.9	8.3
MnmA	40.6 (M)	Apo	36.3	M <sup>4</sup>	36.3	10.6	36.3	10.6
		Holo	36.1	M	36.5	10.1	40.1	1.2
LarE	31.1 (M); 62.2 (D)	Apo	54.1	D	54.2	12.9	54.2	12.9
		Holo	58.8	D	58.8	5.5	60.5	2.7
CyuA	43.7 (M); 87.4 (D)	Apo	77.9	D	77.9	10.9	78.6	10.1
		Holo	78.9	D	78.9	9.7	80.8	7.6
TudS	16.5 (M)	Holo	4.5	M	3.3	80.0	17.9	−8.5

<sup>1</sup> M, monomer; D, dimer. <sup>2</sup> Molar mass determined using the Laser Monitor mode (normal mode) or the Forward Monitor mode (that corrects for absorbing samples). <sup>3</sup>  $[\text{monomer theoretical value} \times N - \text{LM (or FM) value}] / \text{monomer theoretical value} \times N$ , with  $N = 1$  (monomer) or  $N = 2$  (dimer). <sup>4</sup> 4.8% dimeric form was observed in the presence of 5 mM DTT. In the absence of DTT, the % dimer increased to 49.1% [32].

These variations seem to correlate with the differences between the theoretical value of the mass extinction coefficient at 280 nm (obtained using the ProtParam webserver <https://web.expasy.org/protparam/> accessed on 2 February 2022) and the experimental value of the mass extinction coefficient obtained using the ASTRA “UV -extinction from RI peak” method (Table 2). For the apo-proteins, the experimental and theoretical extinction coefficients values are very close to each other, which is not the case for the holo-proteins.



In particular, the huge difference between the theoretical and experimental extinction coefficients for holo-TudS remains unexplained.

**Table 2.** Comparison of the theoretical and experimental extinction coefficients at 280 nm for the six studied [Fe-S] proteins.

Protein Name		Theoretical Extinction Coefficient mL/mg.cm	Experimental Extinction Coefficient mL/mg.cm
mitoNEET	Holo	0.815	1.545
	Apo		0.846
CISD2	Holo	0.616	1.2262
	Apo		0.768
MnmA	Holo	0.993	1.46
	Apo		1.1
LarE	Holo	0.473 <sup>1</sup>	0.638 <sup>2</sup>
	Apo		0.565
CyuA	Holo	0.583	0.858
	Apo		0.733
TudS	Holo	0.514	1.406

<sup>1</sup> no tryptophan; <sup>2</sup> the experimental extinction coefficient value at 280 nm was deduced from the integration of the peak at 410 nm in the UV-visible spectrum.

## 5. Discussion

Our SEC-MALS analysis indicates that both human NEET proteins, mitoNEET and CISD2, are monomeric in their apo-forms but dimeric in their holo-forms. We thus confirm here that the [2Fe-2S] cluster is essential for the stabilization of the dimer of both NEET proteins. We had previously shown that the cluster is essential for the folding of the mitoNEET [42] and CISD2 [26] protomers. Indeed, the loss of the cluster leads to incorrect folding of the protomer and, consequently, to the loss of protein dimerization. Moreover, native mass spectrometry showed that holo-mitoNEET is a dimer but not apo-mitoNEET [29]. It is interesting to note that although the [2Fe-2S] cluster of the two NEET proteins is essential for dimerization, it is not located at the interface between the monomers, as shown by the crystal structures of mitoNEET [43–45] and CISD2 [46]. In contrast to the NEET proteins, LarE and CyuA are intrinsically dimeric because both the apo- and holo-forms are dimers, indicating that the cluster is not crucial for the correct folding of these proteins.

This study reveals the power of SEC-MALS to investigate the involvement of an [Fe-S] cluster in maintaining the oligomerization state of a protein. The binding of a [2Fe-2S] cluster at the dimer interface has been reported for several proteins. Human mitochondrial ISCU2 is the scaffold protein of the ISC (iron–sulfur cluster assembly) complex involved in the synthesis of [Fe-S] clusters in living cells and the subsequent transfer of clusters to target apoproteins. ISCU2 synthesizes a bridging [2Fe-2S] cluster by assembling two ISCU2 monomers. It has recently been explained how, after iron and sulfur loading onto monomeric ISCU2, the interaction between tyrosines, belonging to two different monomers, triggers ISCU2 dimerization and the generation of a bridging [2Fe-2S] cluster [47]. Similarly, human cytosolic monothiol glutaredoxin-3 (GLRX3) is a protein essential for the maturation of cytosolic [4Fe-4S] proteins. Dimeric cluster-bridged GLRX3 transfers its [2Fe-2S] clusters to human NUBP1, an essential early component of the cytosolic iron–sulfur assembly (CIA) machinery [48]. Determining the molar mass of both the apo- and holo-forms of such proteins is essential to shed light on the structural function of the cluster.

## 6. Conclusions

SEC-MALS is a valuable technique to determine the molar mass in solution of proteins in their native state, which does not require desolvation of the sample or very low salt concentrations. The Wyatt miniDAWN TREOS instrument can be used to determine the

absolute molar mass of proteins, even when they exhibit absorption at the laser wavelength, as is the case for the [Fe-S]-containing proteins discussed in this article, by using the Forward Monitor instead of the Laser Monitor mode. At present, the MALS devices on the market, Viscotek TDA 305 and OMNISEC REVEAL from Malvern Panalytical (Malvern, United Kingdom) or LenS3 from Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA), do not provide the possibility to correct for absorption of samples at the laser wavelength. Obtaining the holo-form of these proteins is often difficult because the cluster can be easily destroyed by oxygen, so working under anaerobic conditions is required. In our study, the holo-proteins with labile clusters were purified and frozen anaerobically, and SEC-MALS analysis was performed aerobically immediately after thawing. Whereas it is tempting to determine only the molar mass of the apo-protein, we show here that also determining the molar mass of the holo-protein is crucial for understanding potential changes in oligomerization states upon cluster binding, which may be crucial for the function of the protein, as shown in the case of the [2Fe-2S]-containing NEET proteins.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.V. and B.G.-P.; methodology, C.V.; software, C.V.; validation, C.V., M.-P.G.-C. and B.G.-P.; formal analysis, C.V.; investigation, C.V., J.Z., P.Z., N.H. and M.S.; writing—original draft preparation, C.V. and B.G.-P.; writing—review and editing, C.V., M.-P.G.-C. and B.G.-P.; visualization, C.V.; supervision, B.G.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the French State Program ‘Investissements d’Avenir’ (Grants “LABEX DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We warmly thank Thierry Azoulay from Wyatt technology for sharing his expertise and giving us fruitful advice. We also thank Charlotte Cabanne, Gilles Joucla and Majid Noubhani for technical support with the ENSTBB SEC-MALS apparatus. This work has also benefited from the facilities and expertise of the Macromolecular Interaction Platforms of I2BC.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Uliyanchenko, E. Size-exclusion chromatography—from high-performance to ultra-performance. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 6087–6094. [[CrossRef](#)]
2. Wyatt, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 1–40. [[CrossRef](#)]
3. Wen, J.; Arakawa, T.; Philo, J.S. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 155–166. [[CrossRef](#)]
4. Adawy, A.; Groves, M.R. The Use of Size Exclusion Chromatography to Monitor Protein Self-Assembly. *Crystals* **2017**, *7*, 331. [[CrossRef](#)]
5. Some, D.; Amartely, H.; Tsadok, A.; Lebendiker, M. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *J. Vis. Exp.* **2019**, *148*, e59615. [[CrossRef](#)]
6. Hardouin, P.; Velours, C.; Bou-Nader, C.; Assrir, N.; Laalami, S.; Putzer, H.; Durand, D.; Golinelli-Pimpaneau, B. Dissociation of the Dimer of the Intrinsically Disordered Domain of RNase Y upon Antibody Binding. *Biophys. J.* **2018**, *115*, 2102–2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Serebryany, E.; Folta-Stogniew, E.; Liu, J.; Yan, E.C. Homodimerization enhances both sensitivity and dynamic range of the ligand-binding domain of type 1 metabotropic glutamate receptor. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 4308–4317. [[CrossRef](#)]
8. Proença, D.; Velours, C.; Leandro, C.; Garcia, M.; Pimentel, M.; Sao-Jose, C. A two-component, multimeric endolysin encoded by a single gene. *Mol. Microbiol.* **2015**, *95*, 739–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Loiseau, L.; Fyfe, C.; Aussel, L.; Hajj Chehade, M.; Hernandez, S.B.; Faivre, B.; Hamdane, D.; Mellot-Draznieks, C.; Rascalou, B.; Pelosi, L.; et al. The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 11937–11950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hastie, K.; Rayaprolu, V.; Saphire, E.O. Analysis of Oligomeric and Glycosylated Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled with Multiangle Light Scattering. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2271*, 343–359. [[CrossRef](#)]

11. Zinovyev, G.; Sulaeva, I.; Podzimek, S.; Rössner, D.; Kilpeläinen, I.; Summerskii, I.; Rosenau, T.; Potthast, A. Getting Closer to Absolute Molar Masses of Technical Lignins. *ChemSusChem* **2018**, *11*, 3259–3268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Andreini, C.; Rosato, A.; Banci, L. The relationship between environmental dioxygen and iron-sulfur proteins explored at the genome level. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Beinert, H. Iron-sulfur proteins: Ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 2–15. [[CrossRef](#)]
14. Dinis, P.; Wieckowski, B.M.; Roach, P.L. Metallocofactor assembly for [FeFe]-hydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *41*, 90–97. [[CrossRef](#)]
15. Jeoung, J.H.; Martins, B.M.; Dobbek, H. Double-Cubane [8Fe9S] Clusters: A Novel Nitrogenase-Related Cofactor in Biology. *Chembiochem* **2020**, *21*, 1710–1716. [[CrossRef](#)]
16. Yakovlev, G.; Reda, T.; Hirst, J. Reevaluating the relationship between EPR spectra and enzyme structure for the iron sulfur clusters in NADH:quinone oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12720–12725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Crack, J.C.; Green, J.; Thomson, A.J.; Le Brun, N.E. Iron-sulfur clusters as biological sensors: The chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3196–3205. [[CrossRef](#)]
18. Bouton, C.; Drapier, J.C. Iron regulatory proteins as NO signal transducers. *Sci. STKE* **2003**, *2003*, pe17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Crack, J.C.; Green, J.; Thomson, A.J.; Le Brun, N.E. Iron-sulfur cluster sensor-regulators. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 35–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mettert, E.L.; Kiley, P.J. Fe-S proteins that regulate gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1284–1293. [[CrossRef](#)]
21. Crack, J.C.; Jervis, A.J.; Gaskell, A.A.; White, G.F.; Green, J.; Thomson, A.J.; Le Brun, N.E. Signal perception by FNR: The role of the iron-sulfur cluster. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1144–1148. [[CrossRef](#)]
22. Mettert, E.L.; Kiley, P.J. Reassessing the Structure and Function Relationship of the O<sub>2</sub> Sensing Transcription Factor FNR. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1830–1840. [[CrossRef](#)]
23. Flint, D.H.; Allen, R.M. Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2315–2334. [[CrossRef](#)]
24. Beinert, H.; Kennedy, M.C.; Stout, C.D. Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2335–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Castro, L.; Tórtora, V.; Mansilla, S.; Radi, R. Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2609–2619. [[CrossRef](#)]
26. Salameh, M.; Riquier, S.; Guittet, O.; Huang, M.E.; Vernis, L.; Lepoivre, M.; Golinelli-Cohen, M.P. New Insights of the NEET Protein CISD2 Reveals Distinct Features Compared to Its Close Mitochondrial Homolog mitoNEET. *Biomedicines* **2021**, *9*, 384. [[CrossRef](#)]
27. Karmi, O.; Marjault, H.B.; Pesce, L.; Carloni, P.; Onuchic, J.N.; Jennings, P.A.; Mittler, R.; Nechushtai, R. The unique fold and lability of the [2Fe-2S] clusters of NEET proteins mediate their key functions in health and disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 599–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Golinelli-Cohen, M.-P.; Lescop, E.; Mons, C.; Goncalves, S.; Clemancey, M.; Santolini, J.; Guittet, E.; Blondin, G.; Latour, J.M.; Bouton, C. Redox Control of the Human Iron-Sulfur Repair Protein MitoNEET Activity via Its Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 7583–7593. [[CrossRef](#)]
29. Mons, C.; Botzanowski, T.; Nikolaev, A.; Hellwig, P.; Cianférani, S.; Lescop, E.; Bouton, C.; Golinelli-Cohen, M.-P. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant Fe-S redox switch mitoNEET acts as a pH sensor to repair stress-damaged Fe-S protein. *Biochemistry* **2018**, *57*, 5616–5628. [[CrossRef](#)]
30. Chen, M.; Asai, S.I.; Narai, S.; Nambu, S.; Omura, N.; Sakaguchi, Y.; Suzuki, T.; Ikeda-Saito, M.; Watanabe, K.; Yao, M.; et al. Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4954–4959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Arragain, S.; Bimai, O.; Legrand, P.; Caillat, S.; Ravanat, J.L.; Touati, N.; Binet, L.; Atta, M.; Fontecave, M.; Golinelli-Pimpaneau, B. Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 7355–7360. [[CrossRef](#)]
32. Zhou, J.; Lénon, M.; Touati, N.; Ravanat, J.-L.; Velours, C.; Fontecave, M.; Barras, F.; Golinelli-Pimpaneau, B. Iron sulfur biology invades tRNA modification: The case of U34 sulfuration. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3997–4007. [[CrossRef](#)]
33. Shigi, N. Biosynthesis and Degradation of Sulfur Modifications in tRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11937. [[CrossRef](#)]
34. Fellner, M.; Desguin, B.; Hausinger, R.P.; Hu, J. Structural insights into the catalytic mechanism of a sacrificial sulfur insertase of the N-type ATP pyrophosphatase family, LarE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 9074–9079. [[CrossRef](#)]
35. Zhou, J.; Pecqueur, L.; Aučynaitė, A.; Fuchs, J.; Rutkienė, R.; Vaitekūnas, J.; Meškys, R.; Boll, M.; Fontecave, M.; Urbonavičius, J.; et al. Structural evidence for a [4Fe-5S] intermediate in the non-redox desulfuration of thiouracil. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 424–431. [[CrossRef](#)]
36. Tchong, S.I.; Xu, H.; White, R.H. L-cysteine desulfidase: An [4Fe-4S] enzyme isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* that catalyzes the breakdown of L-cysteine into pyruvate, ammonia, and sulfide. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1659–1670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Mons, C.; Ferecatu, I.; Riquier, S.; Lescop, E.; Bouton, C.; Golinelli-Cohen, M.-P. Combined biochemical, biophysical and cellular methods to study Fe-S cluster transfer and cytosolic aconitase repair by mitoNEET. *Methods Enzymol.* **2017**, *595*, 83–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Zhao, H.; Brown, P.H.; Schuck, P. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2309–2317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lorber, B. Analytical light scattering methods in molecular and structural biology: Experimental aspects and results. *arXiv* **2018**, arXiv:1810.00611.
40. Technical Note TN3000, Wyatt Technology, Calibration and Normalization of MALS Detectors. Available online: <https://chem.uiowa.edu/sites/chem.uiowa.edu/files/groups/TN3000%20-%20Calibration%20and%20Normalization%20of%20MALS%20Detectors%20Rev%20A.pdf> (accessed on 2 February 2022).
41. Freibert, S.A.; Weiler, B.D.; Bill, E.; Pierik, A.J.; Mühlenhoff, U.; Lill, R. Biochemical Reconstitution and Spectroscopic Analysis of Iron–Sulfur Proteins. *Methods Enzymol.* **2018**, *599*, 197–226. [[CrossRef](#)]
42. Ferecatu, I.; Goncalves, S.; Golinelli-Cohen, M.P.; Clemancey, M.; Martelli, A.; Riquier, S.; Guittet, E.; Latour, J.M.; Puccio, H.; Drapier, J.C.; et al. The diabetes drug target MitoNEET governs a novel trafficking pathway to rebuild an Fe-S cluster into cytosolic aconitase/iron regulatory protein 1. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28070–28086. [[CrossRef](#)]
43. Paddock, M.L.; Wiley, S.E.; Axelrod, H.L.; Cohen, A.E.; Roy, M.; Abresch, E.C.; Capraro, D.; Murphy, A.N.; Nechushtai, R.; Dixon, J.E.; et al. MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membraneprotein stabilized by pioglitazone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14342–14347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hou, X.; Liu, R.; Ross, S.; Smart, E.J.; Zhu, H.; Gong, W. Crystallographic studies of human MitoNEET. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33242–33246. [[CrossRef](#)]
45. Lin, J.; Zhou, T.; Ye, K.; Wang, J. Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14640–14645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tamir, S.; Eisenberg-Domovich, Y.; Conlan, A.R.; Stofleth, J.T.; Lipper, C.H.; Paddock, M.L.; Mittler, R.; Jennings, P.A.; Livnah, O.; Nechushtai, R.A. A point mutation in the [2Fe-2S] cluster binding region of the NAF-1 protein (H114C) dramatically hinders the cluster donor properties. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 1572–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Freibert, S.A.; Boniecki, M.T.; Stümpfig, C.; Schulz, V.; Krapoth, N.; Winge, D.R.; Mühlenhoff, U.; Stehling, O.; Cygler, M.; Lill, R. N-terminal tyrosine of ISCU2 triggers [2Fe-2S] cluster synthesis by ISCU2 dimerization. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Camponeschi, F.; Prusty, N.R.; Heider, S.A.E.; Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L. GLRX3 Acts as a [2Fe-2S] Cluster Chaperone in the Cytosolic Iron-Sulfur Assembly Machinery Transferring [2Fe-2S] Clusters to NUBP1. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Conclusion générale

Les composés soufrés, tels que la cystéine et divers cofacteurs enzymatiques, jouent un rôle essentiel dans les processus cellulaires. Leur biosynthèse requiert des enzymes de thiolation spécifiques, et leur concentration intracellulaire doit être étroitement contrôlée pour garantir le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Cette thèse se focalise sur deux enzymes dépendantes d'un centre [4Fe-4S], impliquées dans le métabolisme du soufre chez l'archée anaérobie *Methanococcus maripaludis* : MmCyuA, une L-cystéine désulfidase, et MmLarE, une sulfurtransférase dépendante de l'ATP.

La L-cystéine désulfidase CyuA catalyse la conversion de la L-cystéine en sulfure d'hydrogène et 2-aminoacrylate, ultérieurement transformé en pyruvate et ammoniac. Chez l'archée anaérobie *Methanococcus maripaludis*, qui ne possède pas de L-cystéine désulfurase dépendante du pyridoxal-phosphate, la L-cystéine désulfidase MmCyuA fournit du soufre à la cellule dans des conditions de faible teneur en sulfure. Une analyse phylogénétique menée par un collaborateur indique que CyuA appartient à la même famille de protéines que les L-sérine déshydratases dépendantes du [4Fe-4S]. La cystéine désulfidase est principalement présente chez les bactéries et les micro-organismes anaérobies stricts ou facultatifs. Contrairement à une hypothèse antérieure, la phylogénie de CyuA suggère une origine bactérienne et des acquisitions ultérieures chez les Archaea par transferts horizontaux de gènes. Les expériences comparatives de croissance entre la souche de type sauvage de *Methanococcus maripaludis* et la souche mutante dépourvue du gène codant pour CyuA montrent que cette protéine est non seulement cruciale pour la croissance en présence de sulfure, mais qu'elle permet également à l'archée de croître lentement avec de la cystéine comme seule source de soufre.

Les structures cristallographiques de MmCyuA, avec une résolution allant de 2,8 à 3,1 Å, représentent les premières structures d'une cystéine désulfidase. Elles montrent que l'enzyme est composée de deux domaines structuraux : le domaine N-terminal présente un nouveau pli, tandis que le domaine catalytique C-terminal partage une grande homologie structurelle avec le domaine catalytique des L-sérine déshydratases dépendantes d'un centre [4Fe-4S]. Ces structures, ainsi que des études de mutagenèse dirigée et des analyses spectroscopiques, révèlent l'aptitude de MmCyuA à lier un cluster [4Fe-4S], essentiel à son activité catalytique via quatre cystéines, dont trois sont conservées.

Un mécanisme est ainsi proposé pour la désulfuration de la cystéine, analogue à celui de la sérine déshydratase dépendante du [4Fe-4S] et de la thiouracile désulfidase TudS, qui implique la formation d'une espèce intermédiaire [4Fe-5S]. La structure cristallographique de MmCyuA suggère que Glu25 est le meilleur candidat pour jouer le rôle de base afin de déprotoner le C $\alpha$  du substrat cystéine lors de la catalyse. L'importance de ce résidu est notamment soulignée par le fait que sa mutation en glutamine conduit à une protéine insoluble. Néanmoins, de nouvelles mutations conduisant à des protéines solubles sont nécessaires pour confirmer l'importance de Glu25 dans la catalyse. De même, la mesure de l'effet de la mutation de la quatrième cystéine non conservée mais liant le cluster (Cys289) sur l'activité enzymatique est importante afin de valider le mécanisme réactionnel proposé. De plus, étant donné que la mutation de Cys23 en alanine inactive l'enzyme et qu'elle se situe à proximité d'un site de liaison anionique, il est envisageable que ce résidu joue un rôle important dans la catalyse, bien que celui-ci demeure incompris. Il pourrait également être intéressant de co-cristalliser ce mutant C23A en présence du substrat L-cystéine en vue d'obtenir la structure d'un intermédiaire catalytique avec le substrat lié dans le site actif de l'enzyme.

Enfin, il semble que MmCyuA puisse transférer l'atome de soufre lié au cluster aux enzymes de thiolation de l'ARNt dépendantes d'un centre [4Fe-4S] *in vitro* puisque le système MmCyuA/cystéine peut remplacer le sulfure inorganique comme source de soufre pour ces réactions de thiolation. La fonction principale de MmCyuA pourrait ainsi être de transférer l'atome de soufre mobilisé à partir de la cystéine vers des accepteurs en aval le long des voies de biosynthèse des composés soufrés.

La deuxième partie de cette thèse porte sur l'étude structurale de MmLarE, une sulfurtransférase dépendante de l'ATP qui catalyse la conversion séquentielle des deux groupes carboxylates du précurseur du cofacteur de la lactate racémase en thiocarboxylates. Deux classes d'enzymes LarE sont connues : l'une utilisant une cystéine catalytique comme donneur de soufre sacrificiel, et l'autre utilisant un cluster [4Fe-4S] comme cofacteur. Seule la structure cristalline de LarE de *Lactobacillus plantarum* (LpLarE), appartenant à la première classe, a été résolue. Nous rapportons ici la première structure cristallographique d'une enzyme LarE appartenant à la deuxième classe, sous ses formes sans cluster (apo-) et liée à un cluster (holo-).

La structure de MmLarE holo montre que le cluster [4Fe-4S] est lié par trois cystéines seulement, laissant un site de coordination ouvert sur un atome de fer. Ainsi, le quatrième atome

de fer non lié à une protéine semble se lier à un ligand anionique tel qu'un groupe phosphate ou un ion chlorure pour toutes les molécules de LarE de l'unité asymétrique du cristal. Ces structures, soutenues par les études spectroscopiques de holo-MmLarE et les études biochimiques précédemment rapportées de holo-LarE de *Thermotoga maritima*, nous permettent de proposer un mécanisme réactionnel dans lequel le cluster [4Fe-4S] lie un ligand hydrogénosulfure à la place de l'anion chlorure, formant ainsi un intermédiaire [4Fe-5S], et le transfère au substrat. Ce processus est similaire à celui des enzymes de thiolation de l'ARNt dépendantes d'un cluster [4Fe-4S].

Pour conclure quant à l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse, on peut remarquer que les deux enzymes étudiées sont liées par le métabolisme du soufre, élément autour duquel est articulé le fil conducteur de ce manuscrit, mais également par la dépendance de celles-ci à l'utilisation d'un centre [4Fe-4S] catalytique. Cette constante, présente tout au long de la thèse, souligne non seulement l'utilisation d'un même cofacteur catalytique pour effectuer deux réactions opposées, la désulfuration et la sulfuration ici, mais illustre également la situation dans laquelle différentes protéines orthologues peuvent présenter des mécanismes catalytiques distincts pour effectuer une même réaction. Ainsi, le mécanisme enzymatique de la cystéine désulfidase CyuA dépendante d'un centre [4Fe-4S], pour une réaction de désulfuration de la L-cystéine, est différent de celui utilisé par les cystéines désulfurases, PLP-dépendantes, qui font intervenir des intermédiaires persulfurés. Cette caractérisation structurale de MmCyuA représente ainsi le deuxième exemple d'utilisation non-redox d'un cluster [4Fe-4S] dans une réaction de désulfuration, après celui de la thiouracile désulfidase (TudS) [Zhou, 2021]. De même, dans le cadre de l'étude des enzymes LarE, la caractérisation de MmLarE, qui représente une nouvelle classe de protéines LarE utilisant un cluster [4Fe-4S] catalytique, complète celle de LpLarE, représentant la classe de LarE ayant recours à une cystéine sacrificielle. Dans les deux cas, il existe ainsi au moins deux mécanismes distincts de transfert de soufre pour une même réaction, dont un qui passe par l'utilisation d'un centre [4Fe-4S]. Cette tendance s'additionne aux divers cas de figure similaires, dont certains ont été intentionnellement illustrés dans l'introduction de cette thèse, notamment avec les enzymes de la voie de synthèse de la thiazole et de la 4-thiouridine (Cf. Introduction IV.), mais vaut également pour des réactions qui n'impliquent pas le soufre, comme par exemple chez les sérine déshydratases [Thoden, 2014]. L'utilisation multiple et variée du cofacteur [4Fe-4S] en biologie



pourrait, de mon point de vue, correspondre à une forme d'illustration du concept de "bricolage et évolution" décrit par le Professeur François Jacob en 1977 et dont j'apprécie particulièrement la citation ci-dessous [Jacob, 1977]. Dans ce sens, le centre [4Fe-4S] pourrait représenter un type d'« innovation catalytique » précieuse pour la cellule, qui, lorsqu'elle apparaît quelque part au cours de l'évolution, est souvent (ré)utilisée ailleurs, encore et encore...

*“Biological evolution works like a tinkerer, “who does not know exactly what he is going to produce, but uses whatever he finds around him whether it be pieces of string, fragments of wood, or old cardboards; in short, it works like a ‘bricoleur’ who uses everything at his disposal to produce some kind of workable object””*

*Jacob, F. (1977) Evolution and tinkering. Science 196, 1161–116*











## **Bibliographie**

- Aguilar-Barajas, Esther, César Díaz-Pérez, Martha I. Ramírez-Díaz, Héctor Riveros-Rosas, and Carlos Cervantes. "Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions." *BioMetals* 24 (August 2011): 687–707.
- Albrecht, Alexander G., et al. «SufU Is an Essential Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein in *Bacillus subtilis*.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 192 (March 2010): 1643–1651.
- Alphey, Magnus S., Roderick A. M. Williams, Jeremy C. Mottram, Graham H. Coombs, and William N. Hunter. "The Crystal Structure of *Leishmania major* 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase: A THREE-DOMAIN ARCHITECTURE WITH A SERINE PROTEASE-LIKE TRIAD AT THE ACTIVE SITE." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 278 (November 2003): 48219–48227.
- Alsohaibani, Razan, et al. "Rhodanese-Fold Containing Proteins in Humans: Not Just Key Players in Sulfur Trafficking." *Antioxidants* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 12 (April 2023): 843.
- Andreini, Claudia, et Simone Ciofi-Baffoni. «7. Basic Iron-Sulfur Centers.» Dans *Transition Metals and Sulfur – A Strong Relationship for Life*, 199–256. De Gruyter, 2020.
- Andreini, Claudia, Ivano Bertini, Gabriele Cavallaro, Gemma L. Holliday, and Janet M. Thornton. "Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles." *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13 (November 2008): 1205–1218.
- Aroca, Angeles, Cecilia Gotor, Diane C. Bassham, and Luis C. Romero. "Hydrogen Sulfide: From a Toxic Molecule to a Key Molecule of Cell Life." *Antioxidants* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 9 (July 2020): 621.
- Arragain, Simon, et al. «Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 114 (June 2017): 7355–7360.
- Avvakumov, George V., et al. «Amino-terminal Dimerization, NRDP1-Rhodanese Interaction, and Inhibited Catalytic Domain Conformation of the Ubiquitin-specific Protease 8 (USP8).» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 281 (December 2006): 38061–38070.
- Ayala-Castro, Carla, Avneesh Saini, and F. Wayne Outten. "Fe-S cluster assembly pathways in bacteria." *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 72 (March 2008): 110–125, table of contents.
- Bak, Daniel W., et Sean J. Elliott. «Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry.» *Current Opinion in Chemical Biology* (Elsevier BV) 19 (April 2014): 50–58.
- Bandyopadhyay, Sibali, et al. «A Proposed Role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA Protein as an Intermediate Iron-Sulfur Cluster Carrier.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 283 (May 2008): 14092–14099.
- Banerjee, Manisha, Dhiman Chakravarty, et Anand Ballal. «Molecular basis of function and the unusual antioxidant activity of a cyanobacterial cysteine desulfurase.» *Biochemical Journal* 474 (July 2017): 2435–2447.
- Battistuzzi, Fabia U., Andreia Feijao, et S. Blair Hedges. *BMC Evolutionary Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 4 (2004): 44.
- Begley, Tadhg P., Steven E. Ealick, et Fred W. McLafferty. «Thiamin biosynthesis: still yielding fascinating biological chemistry.» *Biochemical Society Transactions* (Portland Press Ltd.) 40 (May 2012): 555–560.
- Behshad, Elham, et J. Martin Jr. Bollinger. «Kinetic Analysis of Cysteine Desulfurase CD0387 from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Formation of the Persulfide Intermediate.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 48 (December 2009): 12014–12023.
- Beilschmidt, Lena K., et Hélène M. Puccio. «Mammalian Fe–S cluster biogenesis and its implication in disease.» *Biochimie* 100 (May 2014): 48–60.
- Beinert. «Sciences (Etats d'oxydation des clusters).» 1997.
- Beinert, Helmut. «A tribute to sulfur.» *European Journal of Biochemistry* (Wiley) 267 (September 2000): 5657–5664.



- Beinert, Helmut, et al. «Iron-sulfur stoichiometry and structure of iron-sulfur clusters in three-iron proteins: Evidence for [3Fe-4S] clusters.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 80 (January 1983): 393–396.
- Beinert, Helmut, et R. H. Sands. «Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 3 (July 1960): 41–46.
- Benchoam, Dayana, Ernesto Cuevasanta, Matías N. Möller, and Beatriz Alvarez. "Persulfides, at the crossroads between hydrogen sulfide and thiols." *Essays in Biochemistry* 64 (February 2020): 155–168.
- Berg, Matthew D., et Christopher J. Brandl. «Transfer RNAs: diversity in form and function.» *RNA Biology* (Taylor & Francis) 18 (March 2021): 316–339.
- Bestetti, Stefano, et al. "A persulfidation-based mechanism controls aquaporin-8 conductance." *Science Advances* 4 (May 2018): eaar5770.
- Bhubhanil, Sakkarin, Phettree Niamyim, Rojana Sukchawalit, et Skorn Mongkolsuk. «Cysteine desulphurase-encoding gene *sufS2* is required for the repressor function of *RirA* and oxidative resistance in *Agrobacterium tumefaciens*.» *Microbiology* (Microbiology Society,) 160 (2014): 79–90.
- Bianchetti, Davide G. A. M., et al. «D-lactic acidosis in humans: systematic literature review.» *Pediatric Nephrology* (Springer Science and Business Media LLC) 33 (December 2017): 673–681.
- Bimai, Ornella. «The thiolation of uridine 34 in tRNA, which controls protein translation, depends on a [4Fe-4S] cluster in the archaeum *Methanococcus maripaludis*.» 2023.
- Bimai, Ornella, et al. «The thiolation of uridine 34 in tRNA, which controls protein translation, depends on a [4Fe-4S] cluster in the archaeum *Methanococcus maripaludis*.» *Scientific Reports* (Springer Science and Business Media LLC) 13 (April 2023).
- Bimai, Ornella, Simon Arragain, et Béatrice Golinelli-Pimpaneau. «Structure-based mechanistic insights into catalysis by tRNA thiolation enzymes.» *Current Opinion in Structural Biology* (Elsevier BV) 65 (December 2020): 69–78.
- Blachier, Francois, Martin Beaumont, et Eunjung Kim. «Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health.» *Current Opinion in Clinical Nutrition* (Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health)) 22 (January 2019): 68–75.
- Black, Katherine A., and Patricia C. Dos Santos. "Abbreviated Pathway for Biosynthesis of 2-Thiouridine in *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* 197 (June 2015): 1952–1962.
- Black, Katherine A., and Patricia C. Dos Santos. "Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (June 2015): 1470–1480.
- Boncella, Amy E., et al. "The expanding utility of iron-sulfur clusters: Their functional roles in biology, synthetic small molecules, maquettes and artificial proteins, biomimetic materials, and therapeutic strategies." *Coordination Chemistry Reviews* (Elsevier BV) 453 (February 2022): 214229.
- Booker, Squire J., et Cody T. Lloyd. «Twenty Years of Radical SAM! The Genesis of the Superfamily.» 2023.
- Bordo, Domenico, et Peer Bork. «The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily.» *EMBO reports* (John Wiley & Sons, Ltd) 3 (August 2002): 741–746.
- Bottiglieri, Teodoro. «S-Adenosyl-l-methionine (SAMe): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotropic molecule.,,» *The American Journal of Clinical Nutrition* (Elsevier BV) 76 (November 2002): 1151S–1157S.
- Bouvier, Denis, et al. «TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 42 (June 2014): 7960–7970.
- Boyd, Eric S., Khaleh M. Thomas, Yuyuan Dai, Jeff M. Boyd, et F. Wayne Outten. «Interplay between Oxygen and Fe–S Cluster Biogenesis: Insights from the Suf Pathway.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 53 (September 2014): 5834–5847.
- Breuer, Marian, et al. «Essential metabolism for a minimal cell.» *eLife* (eLife Sciences Publications, Ltd) 8 (January 2019).

- Brosnan, John T., and Margaret E. Brosnan. "The sulfur-containing amino acids: an overview." *The Journal of Nutrition* 136 (June 2006): 1636S–1640S.
- Burman, Julia D., Roger L. Harris, Katherine A. Hauton, David M. Lawson, et R. Gary Sawers. «The iron-sulfur cluster in the L-serine dehydratase TdcG from *Escherichia coli* is required for enzyme activity.» *FEBS Letters* (Wiley) 576 (October 2004): 442–444.
- Cardenas-Rodriguez, Mauricio, Afroditi Chatzi, et Kostas Tokatlidis. «Iron–sulfur clusters: from metals through mitochondria biogenesis to disease.» *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* (Springer Science and Business Media LLC) 23 (March 2018): 509–520.
- Carr, Frank J., Don Chill, et Nino Maida. «The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.» *Critical Reviews in Microbiology* (Taylor & Francis) 28 (January 2002): 281–370.
- Cartini, Francesca, William Remelli, Patricia C. Dos Santos, Jutta Papenbrock, Silvia Pagani, and Fabio Forlani. "Mobilization of sulfane sulfur from cysteine desulfurases to the *Azotobacter vinelandii* sulfurtransferase RhdA." *Amino Acids* 41 (June 2011): 141–150.
- Castellano, Immacolata, et Florian P. Seebeck. «On ovothiol biosynthesis and biological roles: from life in the ocean to therapeutic potential.» *Natural Product Reports* (Royal Society of Chemistry (RSC)) 35 (2018): 1241–1250.
- Čavuzić, Mirela, et Yuchen Liu. «Biosynthesis of Sulfur-Containing tRNA Modifications: A Comparison of Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Pathways.» *Biomolecules* (MDPI AG) 7 (March 2017): 27.
- Cerletti, Paolo. «Seeking a better job for an under-employed enzyme: rhodanese.» *Trends in Biochemical Sciences* 11 (September 1986): 369–372.
- Chatterjee. «Sulfur incorporation into biomolecules: recent advances.» 2022.
- Chatterjee, Abhishek, et al. «*Saccharomyces cerevisiae* THI4p is a suicide thiamine thiazole synthase.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 478 (October 2011): 542–546.
- Chatterjee, Sandip, et al. «A comprehensive and scalable database search system for metaproteomics.» *BMC Genomics* 17 (August 2016): 642.
- Chen, Minghao, et al. «Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 114 (May 2017): 4954–4959.
- Chen, Minghao, et al. «The [4Fe-4S] cluster of sulfurtransferase TtuA desulfurizes TtuB during tRNA modification in *Thermus thermophilus*.» *Communications Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 3 (April 2020).
- Cheng, Ronghai, et al. "Single-step Replacement of an Unreactive C-H Bond by a C-S Bond Using Polysulfide as the Direct Sulfur Source in Anaerobic Ergothioneine Biosynthesis." *ACS catalysis* 10 (August 2020): 8981–8994.
- Chowdhury, Mita Mullick, Carsten Dosche, Hans-Gerd Löhmannsröben, and Silke Leimkühler. "Dual Role of the Molybdenum Cofactor Biosynthesis Protein MOCS3 in tRNA Thiolation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Humans." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 287 (May 2012): 17297–17307.
- Cicchillo, Robert M., et Squire J. Booker. «Mechanistic Investigations of Lipoic Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*: Both Sulfur Atoms in Lipoic Acid are Contributed by the Same Lipoyl Synthase Polypeptide.» *Journal of the American Chemical Society* (American Chemical Society) 127 (March 2005): 2860–2861.
- Cicchillo, Robert M., Melissa A. Baker, Eric J. Schnitzer, Elaine B. Newman, Carsten Krebs, and Squire J. Booker. "Escherichia coli L-Serine Deaminase Requires a [4Fe-4S] Cluster in Catalysis \*." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 279 (July 2004): 32418–32425.
- Cipollone, Rita, Paolo Ascenzi, and Paolo Visca. "Common themes and variations in the rhodanese superfamily." *IUBMB Life* 59 (2007): 51–59.
- Cipollone, Rita, Paolo Ascenzi, et Paolo Visca. «Common Themes and Variations in the Rhodanese Superfamily (Critical Review).» *IUBMB Life*, 59(2): 51 – 59, February 2007. 2007.
- Cook, Alasdair M., Heike Laue, et Frank Junker. «Microbial desulfonation.» *FEMS Microbiology Reviews* (Oxford University Press (OUP)) 22 (December 1998): 399–419.
- Cordell, Geoffrey A., et Sujewa N. S. Lamahewage. «Ergothioneine, Ovothiol A, and Selenoneine—Histidine-Derived, Biologically Significant, Trace Global Alkaloids.» *Molecules* (MDPI AG) 27 (April 2022): 2673.

- Corliss, John B., et al. «Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift.» *Science* (American Association for the Advancement of Science (AAAS)) 203 (March 1979): 1073–1083.
- Crack, Jason C., Jeffrey Green, Andrew J. Thomson, et Nick E. Le Brun. «Iron–sulfur cluster sensor-regulators.» *Current Opinion in Chemical Biology* (Elsevier BV) 16 (April 2012): 35–44.
- Cronan, John E. «Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid.» *Current Opinion in Chemical Biology* (Elsevier BV) 47 (December 2018): 60–66.
- Cuevasanta, Ernesto, et al. "Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 290 (November 2015): 26866–26880.
- Cupp-Vickery, Jill R., Hugo Urbina, et Larry E. Vickery. «Crystal Structure of IscS, a Cysteine Desulfurase from *Escherichia coli*.» *Journal of Molecular Biology* 330 (July 2003): 1049–1059.
- Dai, Yuyuan, et F. Wayne Outten. «The *E. coli* SufS–SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS–IscU.» *FEBS Letters* 586 (November 2012): 4016–4022.
- Das, Somnath Shee, et Amit Singh. «The Multifaceted Bacterial Cysteine Desulfurases: From Metabolism to Pathogenesis.» 2021.
- Deere, Thomas M., Divya Prakash, Faith H. Lessner, Evert C. Duin, et Daniel J. Lessner. «*Methanosarcina acetivorans* contains a functional ISC system for iron-sulfur cluster biogenesis.» *BMC Microbiology* (Springer Science and Business Media LLC) 20 (October 2020).
- Desguin, Benoît, et al. «Biosynthesis of the nickel-pincer nucleotide cofactor of lactate racemase requires a CTP-dependent cyclometallase.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 293 (August 2018): 12303–12317.
- Desguin, Benoît, et al. «Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system.» *Nature Communications* (Springer Science and Business Media LLC) 5 (April 2014).
- Desguin, Benoît, et al. "Uncovering a superfamily of nickel-dependent hydroxyacid racemases and epimerases." *Scientific Reports* (Nature Publishing Group) 10 (October 2020): 18123.
- Desguin, Benoît, Patrice Soumilion, Pascal Hols, et Robert P. Hausinger. «Nickel-pincer cofactor biosynthesis involves LarB-catalyzed pyridinium carboxylation and LarE-dependent sacrificial sulfur insertion.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 113 (May 2016): 5598–5603.
- Desguin, Benoît, Tuo Zhang, Patrice Soumilion, Pascal Hols, Jian Hu, and Robert P. Hausinger. "A tethered niacin-derived pincer complex with a nickel-carbon bond in lactate racemase." *Science* 349 (July 2015): 66–69.
- DEWEY, D. L., et J. E. A. N. BEECHER. «Interconversion of Cystine and Cysteine induced by X-rays.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 206 (June 1965): 1369–1370.
- Dos Santos, Patricia C. "B. subtilis as a Model for Studying the Assembly of Fe-S Clusters in Gram-Positive Bacteria." *Methods in Enzymology* 595 (2017): 185–212.
- Dos, Patricia C., et Santos Editor. «Methods in Molecular Biology.» 2353.
- Du, Qinglin, Honghai Wang, et Jianping Xie. «Thiamin (Vitamin B1) Biosynthesis and Regulation: A Rich Source of Antimicrobial Drug Targets?» *International Journal of Biological Sciences* (Ivyspring International Publisher) 7 (2011): 41–52.
- Dunbar, Kyle L. «Enzymatic Carbon–Sulfur Bond Formation in Natural Product Biosynthesis.» 2017.
- Dunkle, Jack A., Michael R. Bruno, F. Wayne Outten, et Patrick A. Frantom. «Structural Evidence for Dimer-Interface-Driven Regulation of the Type II Cysteine Desulfurase, SufS.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 58 (February 2019): 687–696.
- Dupont, Christopher L., Song Yang, Brian Palenik, et Philip E. Bourne. «Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 103 (November 2006): 17822–17827.
- Ebrahimi, Kourosh Honarmand, et al. «Iron–sulfur clusters as inhibitors and catalysts of viral replication.» *Nature Chemistry* (Springer Science and Business Media LLC) 14 (February 2022): 253–266.

- Edmond, J. M., K. L. Von Damm, R. E. McDuff, et C. I. Measures. «Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 297 (May 1982): 187–191.
- Ehrlich, H. «Geomicrobiology: its significance for geology.» *Earth-Science Reviews* (Elsevier BV) 45 (November 1998): 45–60.
- El Yacoubi, Basma, Marc Bailly, and Valérie de Crécy-Lagard. "Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs." *Annual Review of Genetics* 46 (2012): 69–95.
- Eliot, Andrew C., et Jack F. Kirsch. «Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations.» *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004): 383–415.
- Emptage, M. H., T. A. Kent, M. C. Kennedy, H. Beinert, et E. Münck. «Mössbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 80 (August 1983): 4674–4678.
- Esakova, Olga A., et al. «Structural basis for tRNA methylation by the radical SAM enzyme MiaB.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 597 (September 2021): 566–570.
- Eser, Prem K. Chanani Tadhg P. Begley, et Steven E. Ealick. «From suicide enzyme to catalyst: the iron-dependent sulfidetransfer in *Methanococcus jannaschii* thiamin thiazole biosynthesis.» Tech. rep., Journal of the American Chemical Society, 2016.
- Evans, Paul N., et al. «Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics.» *Science* (American Association for the Advancement of Science (AAAS)) 350 (October 2015): 434–438.
- Fellner, Matthias, Benoît Desguin, Robert P. Hausinger, et Jian Hu. «Structural insights into the catalytic mechanism of a sacrificial sulfur insertase of the N-type ATP pyrophosphatase family, LarE.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 114 (August 2017): 9074–9079.
- Fellner, Matthias, Joel A. Rankin, Benoît Desguin, Jian Hu, et Robert P. Hausinger. «Analysis of the Active Site Cysteine Residue of the Sacrificial Sulfur Insertase LarE from *Lactobacillus plantarum*.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 57 (August 2018): 5513–5523.
- Ferain, T., et al. "Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*." *Journal of Bacteriology* 178 (September 1996): 5431–5437.
- Ferla, Matteo P., et Wayne M. Patrick. «Bacterial methionine biosynthesis.» *Microbiology* (Microbiology Society) 160 (August 2014): 1571–1584.
- Filipovic, Milos R., Jasmina Zivanovic, Beatriz Alvarez, et Ruma Banerjee. «Chemical Biology of H<sub>2</sub>S Signaling through Persulfidation.» *Chemical reviews* 118 (February 2018): 1253–1337.
- Flint, Dennis H., et Ronda M. Allen. «Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions.» *Chemical Reviews* (American Chemical Society (ACS)) 96 (January 1996): 2315–2334.
- Fogo, J. K., et Milton Popowsky. «Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide.» *Analytical Chemistry* (American Chemical Society (ACS)) 21 (June 1949): 732–734.
- Forouhar, Farhad, et al. «Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases.» *Nature Chemical Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 9 (March 2013): 333–338.
- Francioso, Antonio, Alessia Baseggio Conrado, Luciana Mosca, et Mario Fontana. «Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology.» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020 (September 2020): 8294158.
- Fräsdorf, Benjamin, Christin Radon, and Silke Leimkühler. "Characterization and Interaction Studies of Two Isoforms of the Dual Localized 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase TUM1 from Humans." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 289 (December 2014): 34543–34556.
- Fuchs, Jonathan, et al. «TudS desulfidases recycle 4-thiouridine-5'-monophosphate at a catalytic [4Fe-4S] cluster.» *Communications Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 6 (October 2023).

- Fugate, Corey J., et Joseph T. Jarrett. «Biotin synthase: Insights into radical-mediated carbon–sulfur bond formation.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824 (November 2012): 1213–1222.
- Fujii, Tomomi, Masaki Maeda, Hisaaki Mihara, Tatsuo Kurihara, Nobuyoshi Esaki, et Yasuo Hata. «Structure of a NifS Homologue: X-ray Structure Analysis of CsdB, an Escherichia coli Counterpart of Mammalian Selenocysteine Lyase.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 39 (February 2000): 1263–1273.
- Fujishiro, Takashi, Ryosuke Nakamura, Kouhei Kunichika, et Yasuhiro Takahashi. «Structural diversity of cysteine desulfurases involved in iron-sulfur cluster biosynthesis.» *Biophysics and Physicobiology* 19 (February 2022): e190001.
- Fukuto, Jon M. "The chemistry of hydropersulfides (RSSH) as related to possible physiological functions." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 743 (July 2023): 109659.
- Fuss, Jill O., Chi-Lin Tsai, Justin P. Ishida, et John A. Tainer. «Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair.» *Biochimica et biophysica acta* 1853 (June 2015): 1253–1271.
- Gaci, Nadia, Guillaume Borrel, William Tottey, Paul William O'Toole, et Jean-François Brugère. «Archaea and the human gut: New beginning of an old story.» *World Journal of Gastroenterology* (Baishideng Publishing Group Inc.) 20 (2014): 16062.
- Galaris, Dimitrios, Alexandra Barbouti, and Kostas Pantopoulos. "Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship." *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (December 2019): 118535.
- Garcia, Pierre Simon / D'Angelo, Sandrine Ollagnier / Dussouchaud Francesca / de Choudens, Emmanuelle / Gribaldo Macha / Bouveret, et Frédéric Simonetta / Barras. «An early origin of iron–sulfur cluster biosynthesis machineries before Earth oxygenation.» *natecolevol*. 2022.
- Genereux, Joseph C., Amie K. Boal, et Jacqueline K. Barton. «DNA-Mediated Charge Transport in Redox Sensing and Signaling.» *Journal of the American Chemical Society* (American Chemical Society (ACS)) 132 (January 2010): 891–905.
- Ghezzi, Daniele, et al. «Mutations of the Mitochondrial-tRNA Modifier MTO1 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy and Lactic Acidosis.» *The American Journal of Human Genetics* (Elsevier BV) 90 (June 2012): 1079–1087.
- Giles, Gregory I., and Claus Jacob. "Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress." *Biological Chemistry* 383 (2002): 375–388.
- Giles, Gregory I., Karen M. Tasker, et Claus Jacob. «Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress.» *Free Radical Biology and Medicine* 31 (November 2001): 1279–1283.
- Giles, Gregory I., Muhammad Jawad Nasim, Wesam Ali, and Claus Jacob. "The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On." *Antioxidants* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 6 (June 2017): 38.
- Göbbels, Luise, et al. «Cysteine: an overlooked energy and carbon source.» *Scientific Reports* (Springer Science and Business Media LLC) 11 (January 2021).
- Goffin, Philippe, et al. «Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying d-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in Lactobacillus plantarum.» *Journal of Bacteriology* 187 (October 2005): 6750–6761.
- Golinelli-Pimpanneau, Beatrice. «Prediction of the Iron–Sulfur Binding Sites in Proteins Using the Highly Accurate Three-Dimensional Models Calculated by AlphaFold and RoseTTAFold.» *Inorganics* (MDPI AG) 10 (December 2021): 2.
- Gottlin, Elizabeth B., et al. "Kinetic Analysis of the Catalytic Domain of Human Cdc25B \*." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 271 (November 1996): 27445–27449.
- Grabowski, Reiner, Antje E. M. Hofmeister, et Wolfgang Buckel. «Bacterial l-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters.» *Trends in Biochemical Sciences* (Elsevier BV) 18 (August 1993): 297–300.
- Griffith, Owen W. *Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview*. Vol. 143, in *The Journal of Nutrition*, 366–376. Academic Press, 1987.
- Großhennig, Stephanie, Till Ischebeck, Johannes Gibhardt, Julia Busse, Ivo Feussner, et Jörg Stülke. «Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of Mycoplasma pneumoniae: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulphydrase HapE.» *Molecular Microbiology* (Wiley) 100 (February 2016): 42–54.

- Gu, Huawei, et al. «Novel Cysteine Desulfidase CdsB Involved in Releasing Cysteine Repression of Toxin Synthesis in *Clostridium difficile*.» *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (January 2018): 531.
- Guedon, Eric, et Isabelle Martin-Verstraete. «Cysteine Metabolism and Its Regulation in Bacteria.» Dans *Amino Acid Biosynthesis Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, 195–218. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Guillén Schlippe, Yollete V., and Lizbeth Hedstrom. "A twisted base? The role of arginine in enzyme-catalyzed proton abstractions." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433 (January 2005): 266–278.
- Guiral, Marianne, et al. «The Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*.» Dans *Advances in Microbial Physiology*, 125–194. Elsevier, 2012.
- Han, Sirui, Yingxi Li, et Haichun Gao. «Generation and Physiology of Hydrogen Sulfide and Reactive Sulfur Species in Bacteria.» *Antioxidants* (MDPI AG) 11 (December 2022): 2487.
- Hansen, Rosa E., Doris Roth, et Jakob R. Winther. «Quantifying the global cellular thiol–disulfide status.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (January 2009): 422–427.
- Hardouin, Pierre, et al. «Dissociation of the Dimer of the Intrinsically Disordered Domain of RNase Y upon Antibody Binding.» *Biophysical Journal* (Elsevier BV) 115 (December 2018): 2102–2113.
- Harris, C. L. «Cysteine and growth inhibition of *Escherichia coli*: threonine deaminase as the target enzyme.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 145 (February 1981): 1031–1035.
- He, Nisha, et al. «A subclass of archaeal U8-tRNA sulfurases requires a [4Fe–4S] cluster for catalysis.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 50 (December 2022): 12969–12978.
- Hensley, Kenneth, et Travis T. Denton. «Alternative functions of the brain transsulfuration pathway represent an underappreciated aspect of brain redox biochemistry with significant potential for therapeutic engagement.» *Free Radical Biology and Medicine* (Elsevier BV) 78 (January 2015): 123–134.
- Hensley, Kenneth, Kalina Venkova, et Alexandar Christov. «Emerging Biological Importance of Central Nervous System Lanthionines.» *Molecules* (MDPI AG) 15 (August 2010): 5581–5594.
- Heßlinger, Christian, Shirley A. Fairhurst, et Gary Sawers. «Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate.» *Molecular Microbiology* (Wiley) 27 (February 1998): 477–492.
- Heuer, Verena, Mark Lever, Yuki Morono, et Andreas Teske. «The Limits of Life and the Biosphere in Earth's Interior.» *Oceanography* (The Oceanography Society) 32 (March 2019): 208–211.
- Hibi, Takao, et al. «Crystal structure of gamma-glutamylcysteine synthetase: Insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 101 (October 2004): 15052–15057.
- Hidese, Ryota, Hisaaki Mihara, et Nobuyoshi Esaki. «Bacterial cysteine desulfurases: versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors.» *Applied Microbiology and Biotechnology* (Springer Science and Business Media LLC) 91 (May 2011): 47–61.
- Hofmeister, A. E. M., S. P. J. Albracht, et W. Buckel. «Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity.» *FEBS Letters* (Wiley) 351 (September 1994): 416–418.
- Holm, Liisa, Aleksii Laiho, Petri Törönen, et Marco Salgado. «DALI shines a light on remote homologs: One hundred discoveries.» *Protein Science* (Wiley) 32 (December 2022).
- Huang, Wen-Cong, et al. «Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of Woesearchaeota.» *Nature Communications* (Springer Science and Business Media LLC) 12 (September 2021).

- Huet, Gaëlle, Jean-Philippe Castaing, Didier Fournier, Mamadou Daffé, et Isabelle Saves. «Protein Splicing of SufB Is Crucial for the Functionality of the Mycobacterium tuberculosis SUF Machinery.» *Journal of Bacteriology* 188 (May 2006): 3412–3414.
- Huet, Gaëlle, Mamadou Daffé, et Isabelle Saves. «Identification of the Mycobacterium tuberculosis SUF Machinery as the Exclusive Mycobacterial System of [Fe-S] Cluster Assembly: Evidence for Its Implication in the Pathogen's Survival.» *Journal of Bacteriology* 187 (September 2005): 6137–6146.
- Ida, Tomoaki, et al. «Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (May 2014): 7606–7611.
- Ikeuchi, Yoshiho, Naoki Shigi, Jun-ichi Kato, Akiko Nishimura, et Tsutomu Suzuki. «Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions.» *Molecular Cell* 21 (January 2006): 97–108.
- ilarion. «Biological Evolution by marvellous Tinkering.» 2009.
- Imlay, James A. "Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen." *Molecular Microbiology* (Wiley) 59 (January 2006): 1073–1082.
- Ingenbleek, Yves, and Hideo Kimura. "Nutritional essentiality of sulfur in health and disease." *Nutrition Reviews* 71 (July 2013): 413–432.
- Isaya, Grazia. «Mitochondrial iron-sulfur cluster dysfunction in neurodegenerative disease.» *Frontiers in Pharmacology* (Frontiers Media SA) 5 (2014).
- Jacob, Claus, Gregory I. Giles, Niroshini M. Giles, and Helmut Sies. "Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function." *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003): 4742–4758.
- Jacob, Francois. «"Evolution and Tinkering".» 1977.
- Jacobson, M. R., et al. «Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 171 (February 1989): 1017–1027.
- Jacobson, Marty R., Valerie L. Cash, Mary C. Weiss, Nancy F. Laird, William E. Newton, and Dennis R. Dean. "Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*." *Molecular and General Genetics MGG* 219 (October 1989): 49–57.
- Jarrett, Joseph T. «Iron–Sulfur Clusters.» Dans *Encyclopedia of Biophysics*, 1153–1156. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- Jarrett, Joseph T. «The Biosynthesis of Thiol- and Thioether-containing Cofactors and Secondary Metabolites Catalyzed by Radical S-Adenosylmethionine Enzymes.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 290 (February 2015): 3972–3979.
- Jenner, Leon P., Mickael V. Cherrier, Patricia Amara, Luis M. Rubio, et Yvain Nicolet. «An unexpected P-cluster like intermediate  $\text{P}^{\text{Fe}} \rightarrow \text{P}^{\text{S}}$  route to the nitrogenase  $\text{FeMo-co}$ .» *Chemical Science* (Royal Society of Chemistry (RSC)) 12 (2021): 5269–5274.
- Jiang, Cheng-Shi, Werner E. G. Müller, Heinz C. Schröder, et Yue-Wei Guo. «Disulfide- and Multisulfide-Containing Metabolites from Marine Organisms.» *Chemical Reviews* (American Chemical Society) 112 (April 2012): 2179–2207.
- Johnson, Christina, Alexis England, Mason Munro-Ehrlich, Daniel R. Colman, Jennifer L. DuBois, et Eric S. Boyd. «Pathways of Iron and Sulfur Acquisition, Cofactor Assembly, Destination, and Storage in Diverse Archaeal Methanogens and Alkanotrophs.» Édité par William W. Metcalf. *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 203 (August 2021).
- Johnson, Matthew P. «Photosynthesis.» *Essays in Biochemistry* 60 (October 2016): 255–273.
- Jones, David T., et Janet M. Thornton. «The impact of AlphaFold2 one year on.» *Nature Methods* (Springer Science and Business Media LLC) 19 (January 2022): 15–20.
- Jones, W. Jack, M. J. B. Paynter, and R. Gupta. "Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment." *Archives of Microbiology* 135 (August 1983): 91–97.
- Jordan, I. King. «Evolutionary tinkering with transposable elements.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 103 (May 2006): 7941–7942.

- Joshi, Jaya, et al. «Bioinformatic and experimental evidence for suicidal and catalytic plant THI4s.» *bioRxiv*. 2020.
- Joshi, Jaya, et al. «Structure and function of aerotolerant, multiple-turnover THI4 thiazole synthases.» *Biochemical Journal* (Portland Press Ltd.) 478 (September 2021): 3265–3279.
- Juedes, Andre, Alexander Bruch, Roland Klassen, Mark Helm, et Raffael Schaffrath. «Sulfur transfer and activation by ubiquitin-like modifier system Uba4-Urm1 link protein urmylation and tRNA thiolation in yeast.» *Microbial Cell* (Shared Science Publishers OG) 3 (November 2016): 554–564.
- Jumper, John, et al. «Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 596 (July 2021): 583–589.
- Jurgenson, Christopher T., Tadhg P. Begley, et Steven E. Ealick. «The Structural and Biochemical Foundations of Thiamin Biosynthesis.» *Annual review of biochemistry* (Annual Reviews) 78 (June 2009): 569–603.
- Kabil, O., V. Vitvitsky, et R. Banerjee. «Sulfur as a signaling nutrient through hydrogen sulfide.» *Annu Rev Nutr.* 2014;34:171-205. 2014.
- Kabil, Omer, et Ruma Banerjee. «Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling.» *Antioxidants Redox Signaling* (Mary Ann Liebert Inc) 20 (February 2014): 770–782.
- Kaila, Ville R. I., et Mårten Wikström. «Architecture of bacterial respiratory chains.» *Nature Reviews Microbiology* (Springer Science and Business Media LLC) 19 (January 2021): 319–330.
- Kaiser, Jens T., Tim Clausen, Gleb P. Bourenkow, Hans-D. Bartunik, Stefan Steinbacher, et Robert Huber. «Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly» Edited by K. Nagai.» *Journal of Molecular Biology* 297 (March 2000): 451–464.
- Kambampati, R., and C. T. Lauhon. "IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA." *Biochemistry* 38 (December 1999): 16561–16568.
- Kari, C., Z. Nagy, P. Kovács, et F. Hernádi. «Mechanism of the Growth Inhibitory Effect of Cysteine on *Escherichia coli*.» *Journal of General Microbiology* (Microbiology Society) 68 (November 1971): 349–356.
- Karunakaran, Anusha. "Investigation of cysteine and methionine oxidation using x-ray absorption spectroscopy." University of British Columbia, 2010.
- Kawano, Yusuke, et al. «Improved fermentative l-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*.» *Applied Microbiology and Biotechnology* (Springer Science and Business Media LLC) 101 (July 2017): 6879–6889.
- Kawano, Yusuke, Kengo Suzuki, and Iwao Ohtsu. "Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize l-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (October 2018): 8203–8211.
- Kessler, Dorothea. «Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes.» *FEMS Microbiology Reviews* (Oxford University Press (OUP)) 30 (November 2006): 825–840.
- Khodour, Yara. «Iron-sulfur clusters in nucleic acid metabolism: Varying roles of ancient cofactors.» 2019.
- Kim, Geumsoo, Stephen J. Weiss, et Rodney L. Levine. «Methionine oxidation and reduction in proteins.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (February 2014): 901–905.
- Kim, Sunmin, et SangYoun Park. «Structural Changes during Cysteine Desulfurase CsdA and Sulfur Acceptor CsdE Interactions Provide Insight into the trans-Persulfuration\*.» *Journal of Biological Chemistry* 288 (September 2013): 27172–27180.
- Kimura, Hideo. «Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide.» *Antioxidants Redox Signaling* (Mary Ann Liebert Inc) 20 (February 2014): 783–793.
- Kimura, Yuka, et al. "Identification of H<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain." *Scientific Reports* (Nature Publishing Group) 5 (October 2015): 14774.
- Kiyasu, Tatsuya, Akira Asakura, Yoshie Nagahashi, et Tatsuo Hoshino. «Contribution of Cysteine Desulfurase (NifS) Protein to the Biotin Synthase Reaction of *Escherichia*



- coli» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 182 (May 2000): 2879–2885.
- Kobayashi, K., et al. "Essential *Bacillus subtilis* genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (April 2003): 4678–4683.
- Kocsis, M. G., K. D. Nolte, D. Rhodes, T. L. Shen, D. A. Gage, and A. D. Hanson. "Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora*. Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates." *Plant Physiology* 117 (May 1998): 273–281.
- Koenigsnecht, Mark J., et Diana M. Downs. «Thiamine biosynthesis can be used to dissect metabolic integration.» *Trends in Microbiology* 18 (June 2010): 240–247.
- Korshunov, Sergey, Karin R. Chonoles Imlay, et James A. Imlay. «Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter.» *Molecular Microbiology* (Wiley) 113 (November 2019): 22–39.
- Kotera, Masaaki, et al. "Comprehensive genomic analysis of sulfur-relay pathway genes." *Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics* 24 (2010): 104–115.
- Kredich, Nicholas M. «Biosynthesis of Cysteine.» *ASM Journals*. 2008.
- Kredich, Nicholas M. «Biosynthesis of Cysteine.» Édité par Valley Stewart. *EcoSal Plus* (American Society for Microbiology) 3 (February 2008).
- Kriek, Marco, Liv Peters, Yasahiro Takahashi, et Peter L. Roach. «Effect of iron–sulfur cluster assembly proteins on the expression of *Escherichia coli* lipoic acid synthase.» *Protein Expression and Purification* 28 (April 2003): 241–245.
- Krishnamoorthy, Kalyanaraman, et Tadhg P. Begley. «Protein Thiocarboxylate-Dependent Methionine Biosynthesis in *Wolinella succinogenes*.» *Journal of the American Chemical Society* (American Chemical Society (ACS)) 133 (December 2010): 379–386.
- Kruihof, Paul D., et al. "Unraveling the role of thiosulfate sulfurtransferase in metabolic diseases." *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1866 (June 2020): 165716.
- Kumar, Arun, et al. «Homocysteine- and cysteine-mediated growth defect is not associated with induction of oxidative stress response genes in yeast.» *Biochemical Journal* (Portland Press Ltd.) 396 (April 2006): 61–69.
- Kumar, Roshan, et Ruma Banerjee. «Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide.» *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Taylor & Francis) 56 (May 2021): 221–235.
- Kung, Hsiang-Fu, Carlos Spears, Ronald C. Greene, et Herbert Weissbach. «Regulation of the terminal reactions in methionine biosynthesis by vitamin B12 and methionine.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Elsevier BV) 150 (May 1972): 23–31.
- Landgraf, Bradley J., Erin L. McCarthy, et Squire J. Booker. «Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Human Health and Disease.» *Annual Review of Biochemistry* (Annual Reviews) 85 (June 2016): 485–514.
- Lanz, Nicholas D., et Squire J. Booker. «Identification and function of auxiliary iron–sulfur clusters in radical SAM enzymes.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* (Elsevier BV) 1824 (November 2012): 1196–1212.
- Laubichler, Manfred D. "Tinkering: a conceptual and historical evaluation." *Novartis Foundation Symposium* 284 (2007): 20–29; discussion 29–34, 110–115.
- Lauble, H., M. C. Kennedy, H. Beinert, and C. D. Stout. "Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound." *Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound*. Vol. 31. American Chemical Society, May 2002. 2735–2748.
- Lauhon, C. T., and R. Kambampati. "The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD." *The Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 275 (June 2000): 20096–20103.
- Lauhon, Charles T. «Requirement for *IscS* in Biosynthesis of All Thionucleosides in *Escherichia coli*.» *Journal of Bacteriology* 184 (December 2002): 6820–6829.
- Lauhon, Charles T., Elizabeth Skovran, Hugo D. Urbina, Diana M. Downs, et Larry E. Vickery. «Substitutions in an Active Site Loop of *Escherichia coli* *IscS* Result in Specific Defects in Fe-S Cluster and Thionucleoside Biosynthesis in Vivo.» *Journal of Biological Chemistry* 279 (May 2004): 19551–19558.

- Lec, Jean-Christophe, Séverine Boutserin, Hortense Mazon, Guillermo Mulliert, Sandrine Boschi-Muller, et François Talfournier. «Unraveling the Mechanism of Cysteine Persulfide Formation Catalyzed by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases.» *ACS Catalysis* (American Chemical Society) 8 (March 2018): 2049–2059.
- Lee, Joon-Hee, Won-Sik Yeo, and Jung-Hye Roe. "Induction of the *sufA* operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor." *Molecular Microbiology* 51 (2004): 1745–1755.
- Lehmann, Christopher, Tadhg P. Begley, et Steven E. Ealick. «Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 45 (December 2005): 11–19.
- Leimkühler, Silke, Martin Bühning, et Lena Beilschmidt. «Shared Sulfur Mobilization Routes for tRNA Thiolation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Prokaryotes and Eukaryotes.» *Biomolecules* (MDPI AG) 7 (January 2017): 5.
- Leonardi, R., Y. Zhang, C. Rock, et S. Jackowski. «Coenzyme A: Back in action.» *Progress in Lipid Research* (Elsevier BV) 44 (March 2005): 125–153.
- Leonardi, Roberta, and Peter L. Roach. "Thiamine Biosynthesis in Escherichia coli: IN VITRO RECONSTITUTION OF THE THIAZOLE SYNTHASE ACTIVITY." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 279 (April 2004): 17054–17062.
- Li, T., et al. "Cysteinyl-tRNA formation: the last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis." *FEBS letters* 462 (December 1999): 302–306.
- Libiad, Marouane, et al. «Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 293 (February 2018): 2675–2686.
- Lieberman, Daniel E., and Brian K. Hall. "The evolutionary developmental biology of tinkering: an introduction to the challenge." *Novartis Foundation Symposium* 284 (2007): 1–19; discussion 110–115.
- Lieder, Kafryn W., Squire Booker, Frank J. Ruzicka, Helmut Beinert, George H. Reed, et Perry A. Frey. «S-Adenosylmethionine-Dependent Reduction of Lysine 2,3-Aminomutase and Observation of the Catalytically Functional Iron-Sulfur Centers by Electron Paramagnetic Resonance.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 37 (February 1998): 2578–2585.
- Lill, Roland. «From the discovery to molecular understanding of cellular iron-sulfur protein biogenesis.» *Biol. Chem.* 2020; 401(6–7). 2020.
- Lill, Roland. «Function and biogenesis of iron–sulphur proteins.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 460 (August 2009): 831–838.
- Lill, Roland, et Janneke Balk. «The Cell\textquotesingles Cookbook For Iron-Sulfur Clusters: Recipes For Fool's Gold?» *ChemBioChem* (Wiley) 5 (August 2004): 1044–1049.
- Lim, Jong Gyu, et Sang Ho Choi. «IscR Is a Global Regulator Essential for Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* and Induced by Host Cells.» *Infection and Immunity* (American Society for Microbiology) 82 (January 2014): 569–578.
- Lin, Steven, Ryan E. Hanson, and John E. Cronan. "Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway." *Nature Chemical Biology* (Nature Publishing Group) 6 (September 2010): 682–688.
- Lin, Steven, Ryan E. Hanson, and John E. Cronan. "Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway." *Nature Chemical Biology* (Nature Publishing Group) 6 (September 2010): 682–688.
- Lin, Winston C., Yu-Ling Yang, et William B. Whitman. «The anabolic pyruvate oxidoreductase from *Methanococcus maripaludis*.» *Archives of Microbiology* (Springer Science and Business Media LLC) 179 (May 2003): 444–456.
- Lin, Winston, et William B. Whitman. «The importance of *porE* and *porF* in the anabolic pyruvate oxidoreductase of *Methanococcus maripaludi s*.» *Archives of Microbiology* (Springer Science and Business Media LLC) 181 (January 2004): 68–73.
- Liochev, Stefan I. «Commentary: The Role of Iron-Sulfur Clusters in vivo Hydroxyl Radical Production.» *Free Radical Research* (Informa UK Limited) 25 (January 1996): 369–384.

- Liu, Yuchen, et al. «Ancient translation factor is essential for tRNA-dependent cysteine biosynthesis in methanogenic archaea.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 111 (July 2014): 10520–10525.
- Liu, Yuchen, et al. «Catalytic Mechanism of Sep-tRNA:Cys-tRNA Synthase.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 287 (February 2012): 5426–5433.
- Liu, Yuchen, Magdalena Sieprawska-Lupa, William B. Whitman, et Robert H. White. «Cysteine Is Not the Sulfur Source for Iron-Sulfur Cluster and Methionine Biosynthesis in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*.» *The Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 285 (October 2010): 31923–31929.
- Llorens, José Vicente, Sirena Soriano, Pablo Calap-Quintana, Pilar Gonzalez-Cabo, et María Dolores Moltó. «The Role of Iron in Friedreich's Ataxia: Insights From Studies in Human Tissues and Cellular and Animal Models.» *Frontiers in Neuroscience* (Frontiers Media SA) 13 (February 2019).
- Lloyd, Karen G., et al. «Effects of Dissolved Sulfide, pH, and Temperature on Growth and Survival of Marine Hyperthermophilic Archaea.» *Applied and Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 71 (October 2005): 6383–6387.
- Lloyd, S. J., H. Lauble, G. S. Prasad, et C. D. Stout. «The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a:citrate complex.» (Wiley) 8 (December 2008): 2655–2662.
- Loddeke, Melissa, Barbara Schneider, Tamiko Oguri, Iti Mehta, Zhenyu Xuan, et Larry Reitzer. «Anaerobic Cysteine Degradation and Potential Metabolic Coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 199 (July 2017): e00117–17.
- Loiseau, Laurent, et al. «ErpA, an iron–sulfur (Fe–S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 104 (August 2007): 13626–13631.
- Lonsdale, Derrick. «A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin(e) and Its Derivatives.» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Hindawi Limited) 3 (2006): 49–59.
- Lorenz, Christian, Christina E. Lünse, and Mario Mörl. "tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation." *Biomolecules* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 7 (June 2017): 35.
- Lotierzo, M., B. Tse Sum Bui, D. Florentin, F. Escalettes, et A. Marquet. «Biotin synthase mechanism: an overview.» *Biochemical Society Transactions* (Portland Press Ltd.) 33 (August 2005): 820–823.
- Lu, Shelly C. «Glutathione synthesis.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* (Elsevier BV) 1830 (May 2013): 3143–3153.
- Lu, Shelly C. «Regulation of glutathione synthesis.» *Molecular Aspects of Medicine* (Elsevier BV) 30 (February 2009): 42–59.
- Lyons, Timothy W., Christopher T. Reinhard, et Noah J. Planavsky. «The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 506 (February 2014): 307–315.
- Lyu, Zhe, et Yahai Lu. «Metabolic shift at the class level sheds light on adaptation of methanogens to oxidative environments.» *The ISME Journal* (Springer Science and Business Media LLC) 12 (November 2017): 411–423.
- Major, Tiffany A., Henry Burd, et William B. Whitman. «Abundance of 4Fe4S motifs in the genomes of methanogens and other prokaryotes.» *FEMS Microbiology Letters* (Oxford University Press (OUP)) 239 (October 2004): 117–123.
- Marangoni, Natalia, Kathy Kowal, Zane Deliu, Kenneth Hensley, et Douglas L. Feinstein. «Neuroprotective and neurotrophic effects of Lanthionine Ketimine Ester.» *Neuroscience Letters* (Elsevier BV) 664 (January 2018): 28–33.
- Marquet, Andrée, Bernadette Tse Sum Bui, et Dominique Florentin. «Biosynthesis of biotin and lipoic acid.» Dans *Vitamins and Hormones*, 51–101. Elsevier, 2001.
- Martinez, David Lopez, Yugo Tsuchiya, et Ivan Gout. «Coenzyme A biosynthetic machinery in mammalian cells.» *Biochemical Society Transactions* (Portland Press Ltd.) 42 (August 2014): 1112–1117.

- Martinez-Gomez, N. Cecilia, Lauren D. Palmer, Eugenio Vivas, Peter L. Roach, et Diana M. Downs. «The Rhodanese Domain of ThiI Is Both Necessary and Sufficient for Synthesis of the Thiazole Moiety of Thiamine in *Salmonella enterica*.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 193 (September 2011): 4582–4587.
- Matthies, Andreas, K. V. Rajagopalan, Ralf R. Mendel, et Silke Leimkühler. «Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 101 (April 2004): 5946–5951.
- Mayr, Simon J., Ralf-R. Mendel, et Guenter Schwarz. «Molybdenum cofactor biology, evolution and deficiency.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (Elsevier BV) 1868 (January 2021): 118883.
- McCarthy, Erin L. «Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase.» 2017.
- McCarthy, Erin L., et Squire J. Booker. «Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase.» *Science* (American Association for the Advancement of Science) 358 (October 2017): 373–377.
- McCoy, Airlie J., Ralf W. Grosse-Kunstleve, Paul D. Adams, Martyn D. Winn, Laurent C. Storoni, et Randy J. Read. «Phaser crystallographic software.» *Journal of Applied Crystallography* (International Union of Crystallography (IUCr)) 40 (July 2007): 658–674.
- McLaughlin, Martin I., Nicholas D. Lanz, Peter J. Goldman, Kyung-Hoon Lee, Squire J. Booker, et Catherine L. Drennan. «Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 113 (August 2016): 9446–9450.
- Medvedev, Kirill E., Lisa N. Kinch, R. Dustin Schaeffer, et Nick V. Grishin. «Functional analysis of Rossmann-like domains reveals convergent evolution of topology and reaction pathways.» Édité par Dan S. Tawfik. *PLOS Computational Biology* (Public Library of Science (PLoS)) 15 (December 2019): e1007569.
- Melideo, Scott L., Michael R. Jackson, et Marilyn Schuman Jorns. «Biosynthesis of a Central Intermediate in Hydrogen Sulfide Metabolism by a Novel Human Sulfurtransferase and Its Yeast Ortholog.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 53 (July 2014): 4739–4753.
- Mendel, Ralf R., Thomas W. Hercher, Arkadiusz Zupok, Muhammad A. Hasnat, and Silke Leimkühler. "The Requirement of Inorganic Fe-S Clusters for the Biosynthesis of the Organometallic Molybdenum Cofactor." *Inorganics* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 8 (July 2020): 43.
- Méndez, Jessica, Pilar Reimundo, David Pérez-Pascual, Roberto Navais, Esther Gómez, and José A. Guijarro. "A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*." *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 193 (February 2011): 944–951.
- Mihara, H., and N. Esaki. "Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (October 2002): 12–23.
- Mihara, Hisaaki, Tomomi Fujii, Shin-ichiro Kato, Tatsuo Kurihara, Yasuo Hata, et Nobuyoshi Esaki. «Structure of External Aldimine of *Escherichia coli* CsdB, an IscS/Nifs Homolog: Implications for Its Specificity toward Selenocysteine1.» *The Journal of Biochemistry* 131 (May 2002): 679–685.
- Mikami, Yoshinori, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Noriyuki Nagahara, Yuki Ogasawara, et Hideo Kimura. «Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide.» *Biochemical Journal* 439 (October 2011): 479–485.
- Miller, Halie K., et al. "IscR Is Essential for *Yersinia pseudotuberculosis* Type III Secretion and Virulence." *PLOS Pathogens* (Public Library of Science) 10 (June 2014): e1004194.
- Millikin, Robert, et al. "The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation." *Free Radical Biology & Medicine* 97 (August 2016): 136–147.

- Miranda, Katrina M., et David A. Wink. «Persulfides and the cellular thiol landscape.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 111 (May 2014): 7505–7506.
- Morra, Matthew J., et Warren A. Dick. «Mechanisms of H<sub>2</sub>S Production from Cysteine and Cystine by Microorganisms Isolated from Soil by Selective Enrichment.» *Applied and Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 57 (May 1991): 1413–1417.
- Moseler, Anna, Benjamin Selles, Nicolas Rouhier, and Jérémy Couturier. "Novel insights into the diversity of the sulfurtransferase family in photosynthetic organisms with emphasis on oak." *The New Phytologist* 226 (May 2020): 967–977.
- Mueller, E. «Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 26 (June 1998): 2606–2610.
- Mueller, Eugene G. «Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways.» *Nature Chemical Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 2 (March 2006): 185–194.
- Mueller, Eugene G., Peter M. Palenchar, et Christopher J. Buck. «The Role of the Cysteine Residues of ThiI in the Generation of 4-Thiouridine in tRNA.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 276 (September 2001): 33588–33595.
- Mukhopadhyay, Rita, Jin Shi, and Barry P. Rosen. "Purification and Characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* Arsenate Reductase \*." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 275 (July 2000): 21149–21157.
- Mustafa, Asif K., et al. «H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration.» *Science Signaling* (American Association for the Advancement of Science (AAAS)) 2 (November 2009).
- Nagahara, Noriyuki, and Takeshi Nishino. "Role of Amino Acid Residues in the Active Site of Rat Liver Mercaptopyruvate Sulfurtransferase: cDNA CLONING, OVEREXPRESSION, AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 271 (November 1996): 27395–27401.
- Nakamura, Ryosuke, Masahide Hikita, Shoko Ogawa, Yasuhiro Takahashi, and Takashi Fujishiro. "Snapshots of PLP-substrate and PLP-product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes." *The FEBS Journal* (Wiley) 287 (October 2020): 1138–1154.
- Nass, Karol, et al. «Indications of radiation damage in ferredoxin microcrystals using high-intensity X-FEL beams.» *Journal of Synchrotron Radiation* (International Union of Crystallography (IUCr)) 22 (February 2015): 225–238.
- Neumann, Piotr, Kristina Lakomek, Peter-Thomas Naumann, Whitney M. Erwin, Charles T. Lauhon, et Ralf Ficner. «Crystal structure of a 4-thiouridine synthetase–RNA complex reveals specificity of tRNA U8 modification.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 42 (April 2014): 6673–6685.
- Nicolet, Yvain. «Structure–function relationships of radical SAM enzymes.» *Nature Catalysis* (Springer Science and Business Media LLC) 3 (April 2020): 337–350.
- Noma, Akiko, Yuriko Sakaguchi, et Tsutomu Suzuki. «Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 37 (January 2009): 1335–1352.
- Nonaka, Gen, et Kazuhiro Takumi. «Cysteine degradation gene yhaM, encoding cysteine desulfidase, serves as a genetic engineering target to improve cysteine production in *Escherichia coli*.» *AMB Express* (Springer Science and Business Media LLC) 7 (May 2017): 90.
- Novartis Foundation Symposium, 284. «Tinkering: The Microevolution of Development.» *Tinkering: The Microevolution of Development*. s.d.
- Numata, Tomoyuki, Yoshiho Ikeuchi, Shuya Fukai, Tsutomu Suzuki, et Osamu Nureki. «Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate.» *Nature* (Springer Science and Business Media LLC) 442 (July 2006): 419–424.
- O'Donoghue, Patrick, Anurag Sethi, Carl R. Woese, and Zaida A. Luthey-Schulten. "The evolutionary history of Cys-tRNA<sup>Cys</sup> formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (December 2005): 19003–19008.
- Ohnishi, Tomoko, Vladimir D. Sled, Takahiro Yano, Takao Yagi, Dosymzhan S. Burbaev, et Andrei D. Vinogradov. «Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the

- NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1365 (June 1998): 301–308.
- Ono, Bun-ichiro, Kazuhide Naito, Yoh-Ichi Shirahige, et Mahoko Yamamoto. «Regulation of cystathionine gamma-lyase in *Saccharomyces cerevisiae*.» *Yeast* (Wiley) 7 (November 1991): 843–848.
- Outten, F. Wayne. "Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches." *Nature Chemical Biology* (Nature Publishing Group) 3 (April 2007): 206–207.
- Outten, F. Wayne, Matthew J. Wood, F. Michael Muñoz, et Gisela Storz. «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* \*.» *Journal of Biological Chemistry* 278 (November 2003): 45713–45719.
- Outten, F. Wayne, Ouliana Djaman, and Gisela Storz. "A suf operon requirement for Fe–S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* 52 (2004): 861–872.
- Pain, Debkumar, et Andrew Dancis. «Roles of Fe–S proteins: from cofactor synthesis to iron homeostasis to protein synthesis.» *Current Opinion in Genetics Development* (Elsevier BV) 38 (June 2016): 45–51.
- Pajares, María A., et Dolores Pérez-Sala. «Mammalian Sulfur Amino Acid Metabolism: A Nexus Between Redox Regulation, Nutrition, Epigenetics, and Detoxification.» *Antioxidants Redox Signaling* (Mary Ann Liebert Inc) 29 (August 2018): 408–452.
- Pal, Virender Kumar, Parijat Bandyopadhyay, et Amit Singh. «Hydrogen sulfide in physiology and pathogenesis of bacteria and viruses.» *IUBMB Life* (Wiley) 70 (March 2018): 393–410.
- Park, Chung-Min, Laksiri Weerasinghe, Jacob J. Day, Jon M. Fukuto, et Ming Xian. «Persulfides: Current Knowledge and Challenges in Chemistry and Chemical Biology.» *Molecular bioSystems* 11 (July 2015): 1775–1785.
- Park, Sunny, et James A. Imlay. «High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 185 (March 2003): 1942–1950.
- Paul, Bindu D., et Andrew A. Pieper. «Protective Roles of Hydrogen Sulfide in Alzheimer's Disease and Traumatic Brain Injury.» *Antioxidants* (MDPI AG) 12 (May 2023): 1095.
- Paul, Bindu D., et Solomon H. Snyder. *Chapter Five - Protein Sulphydration*. Vol. 555, édité par Enrique Cadenas et Lester Packer, 79–90. Academic Press, 2015.
- Paul, Bindu D., et Solomon H. Snyder. «Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease.» *Biochemical Pharmacology* (Elsevier BV) 149 (March 2018): 101–109.
- Paul, Bindu D., et Solomon H. Snyder. «H<sub>2</sub>S signalling through protein sulphydration and beyond.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 13 (July 2012): 499–507.
- Paulsen, Candice E., and Kate S. Carroll. "Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery." *Chemical Reviews* 113 (July 2013): 4633–4679.
- Payne, Devon, et al. «Examining Pathways of Iron and Sulfur Acquisition, Trafficking, Deployment, and Storage in Mineral-Grown Methanogen Cells.» Édité par Michael Y. Galperin. *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 203 (September 2021).
- Payne, Devon, Rachel L. Spietz, et Eric S. Boyd. «Reductive dissolution of pyrite by methanogenic archaea.» *The ISME Journal* (Springer Science and Business Media LLC) 15 (June 2021): 3498–3507.
- Pedre, Brandán, and Tobias P. Dick. "3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase: an enzyme at the crossroads of sulfane sulfur trafficking." *Biological Chemistry* 402 (February 2021): 223–237.
- Pedre, Brandán, et al. «3-Mercaptopyruvate sulfur transferase is a protein persulfidase.» *Nature Chemical Biology* (Springer Science and Business Media LLC) 19 (February 2023): 507–517.
- Pedrioli, Patrick G. A., Sebastian Leidel, et Kay Hofmann. «Urm1 at the crossroad of modifications.» *EMBO reports* (EMBO) 9 (December 2008): 1196–1202.
- Pegg, Anthony E. «S-Adenosylmethionine decarboxylase.» Édité par Heather M. Wallace. *Essays in Biochemistry* (Portland Press Ltd.) 46 (October 2009): 25–46.

- Pérard, J., et Sandrine Ollagnier de Choudens. «Iron–sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: close to the molecular mechanism understanding.» *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* (Springer Science and Business Media LLC) 23 (December 2017): 581–596.
- Petrikovics, Ilona, et al. «Organ-distribution of the metabolite 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid in a rat model following cyanide exposure.» *Biomarkers* (Informa UK Limited) 16 (October 2011): 686–690.
- Polegato, Bertha F., et al. «Role of Thiamin in Health and Disease.» *Nutrition in Clinical Practice* (Wiley) 34 (January 2019): 558–564.
- Pratap Singh, Krishn, Amir Zaidi, Shadab Anwar, Sanjeev Bimal, Pradeep Das, et Vahab Ali. «Reactive oxygen species regulates expression of iron–sulfur cluster assembly protein IscS of *Leishmania donovani*.» *Free Radical Biology and Medicine* 75 (October 2014): 195–209.
- Py Béatrice, Barras Frédéric. «Du fer et du soufre dans les protéines.» 2014.
- Py, Béatrice, et al. "Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier." *Molecular Microbiology* 86 (2012): 155–171.
- Py, Béatrice, et Frédéric Barras. «Building Fe–S proteins: bacterial strategies.» *Nature Reviews Microbiology* (Springer Science and Business Media LLC) 8 (June 2010): 436–446.
- Rajagopalan, Senapathy, Sarah J. Teter, Petrus H. Zwart, Richard G. Brennan, Kevin J. Phillips, et Patricia J. Kiley. «Studies of IscR reveal a unique mechanism for metal-dependent regulation of DNA binding specificity.» *Nature structural & molecular biology* 20 (June 2013): 740–747.
- Rajakovich, Lauren J., John Tomlinson, et Patricia C. Dos Santos. «Functional Analysis of *Bacillus subtilis* Genes Involved in the Biosynthesis of 4-Thiouridine in tRNA.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 194 (September 2012): 4933–4940.
- Rankin, Joel A., et al. «The LarB carboxylase/hydrolase forms a transient cysteinyl-pyridine intermediate during nickel-pincer nucleotide cofactor biosynthesis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 118 (September 2021).
- Read, Austin D., Rachel E. T. Bentley, Stephen L. Archer, et Kimberly J. Dunham-Snary. «Mitochondrial iron–sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology.» *Redox Biology* 47 (November 2021): 102164.
- Riboldi, Gustavo P., Hugo Verli, and Jeverson Frazzon. "Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein." *BMC biochemistry* 10 (February 2009): 3.
- Roche, Béatrice, Laurent Aussel, Benjamin Ezraty, Pierre Mandin, Béatrice Py, et Frédéric Barras. «Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827 (March 2013): 455–469.
- Roche, Béatrice, Rym Agrebi, Allison Huguenot, Sandrine Ollagnier de Choudens, Frédéric Barras, et Béatrice Py. "Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism." *PLOS Genetics* (Public Library of Science) 11 (May 2015): e1005134.
- Rossetto, Daniele, et Sheref S. Mansy. «Metals Are Integral to Life as We Know It.» *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Frontiers Media SA) 10 (March 2022).
- Rouault, Tracey A. «Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease.» *Disease Models and Mechanisms* (The Company of Biologists) 5 (March 2012): 155–164.
- Rouault, Tracey A., et Wing Hang Tong. «Iron–sulfur cluster biogenesis and human disease.» *Trends in genetics : TIG* 24 (August 2008): 398–407.
- Rückert, Christian. «Sulfate reduction in microorganisms — recent advances and biotechnological applications.» *Current Opinion in Microbiology* (Elsevier BV) 33 (October 2016): 140–146.
- Rybniker, Jan, et al. «The cysteine desulfurase IscS of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in iron–sulfur cluster biogenesis and oxidative stress defence.» *Biochemical Journal* 459 (April 2014): 467–478.
- Salaemae, Wanisa, Grant W. Booker, et Steven W. Polyak. «The Role of Biotin in Bacterial Physiology and Virulence: a Novel Antibiotic Target for *Mycobacterium tuberculosis*.» Édité par Indira T. Kudva et Bryan H. Bellaire. *Microbiology Spectrum* (American Society for Microbiology) 4 (March 2016).

- Santos, Joana A., Pedro José Barbosa Pereira, et Sandra Macedo-Ribeiro. «What a difference a cluster makes: The multifaceted roles of IscR in gene regulation and DNA recognition.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1854 (September 2015): 1101–1112.
- Sauerwald. «RNA-Dependent Cysteine Biosynthesis in Archaea.» *Science* 307, 1969 (2005); DOI: 10.1126/science. 2012.
- Saund, Simran S., et al. «The chemical biology of hydropersulfides (RSSH): Chemical stability, reactivity and redox roles.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 588 (December 2015): 15–24.
- Sawa, Tomohiro, Hozumi Motohashi, Hideshi Ihara, and Takaaki Akaike. "Enzymatic Regulation and Biological Functions of Reactive Cysteine Persulfides and Polysulfides." *Biomolecules* 10 (August 2020): 1245.
- Sbodio, Juan I., Solomon H. Snyder, and Bindu D. Paul. "Regulators of the transsulfuration pathway." *British Journal of Pharmacology* (Wiley) 176 (August 2019): 583–593.
- Schmidt, Ahlert, William R. ABRAMS, et Jerome A. SCHIFF. «Reduction of Adenosine 5'-phosphosulfate to Cysteine in Extracts from Chlorella and Mutants Blocked for Sulfate Reduction.» *European Journal of Biochemistry* (Wiley) 47 (September 1974): 423–434.
- Schmidt, Sidsel Birkelund, Marion Eisenhut, and Anja Schneider. "Chloroplast Transition Metal Regulation for Efficient Photosynthesis." *Trends in Plant Science* (Elsevier) 25 (August 2020): 817–828.
- Schröder, Gunnar F., Michael Levitt, et Axel T. Brunger. «Deformable elastic network refinement for low-resolution macromolecular crystallography.» *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* (International Union of Crystallography (IUCr)) 70 (August 2014): 2241–2255.
- Schwartz, C. J., O. Djaman, J. A. Imlay, and P. J. Kiley. "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 of the United States of America* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 97 (August 2000): 9009–9014.
- Schwarz, Guenter. «Molybdenum cofactor and human disease.» *Current Opinion in Chemical Biology* 31 (April 2016): 179–187.
- Sekowska, A., H. F. Kung, and A. Danchin. "Sulfur metabolism in Escherichia coli and related bacteria: facts and fiction." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2 (April 2000): 145–177.
- Selbach, Bruna P., Alexander H. Chung, Aubrey D. Scott, Simon J. George, Stephen P. Cramer, et Patricia C. Dos Santos. «Fe-S Cluster Biogenesis in Gram-Positive Bacteria: SufU Is a Zinc-Dependent Sulfur Transfer Protein.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 53 (January 2014): 152–160.
- Selbach, Bruna P., Pradyumna K. Pradhan, et Patricia C. Dos Santos. «Protected Sulfur Transfer Reactions by the Escherichia coli Suf System.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 52 (June 2013): 4089–4096.
- Selbach, Bruna, Emily Earles, et Patricia C. Dos Santos. «Kinetic Analysis of the Bisubstrate Cysteine Desulfurase SufS from Bacillus subtilis.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 49 (October 2010): 8794–8802.
- Selles, Benjamin, Anna Moseler, Nicolas Rouhier, et Jérémy Couturier. «Rhodanese domain-containing sulfurtransferases: multifaceted proteins involved in sulfur trafficking in plants.» Édité par Stanislav Kopriva. *Journal of Experimental Botany* (Oxford University Press (OUP)) 70 (May 2019): 4139–4154.
- Settembre, Ethan C., et al. «Thiamin Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Structure of the Thiazole Synthase/Sulfur Carrier Protein Complex.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 43 (August 2004): 11647–11657.
- Sharma, Anil K., Leif J. Pallesen, Robert J. Spang, and William E. Walden. "Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly (CIA) System: Factors, Mechanism, and Relevance to Cellular Iron Regulation." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 285 (August 2010): 26745–26751.
- Shepard, Eric M. «Radical SAM et ex biotine etc.» 2010.



- Shepard, Eric M., Eric S. Boyd, Joan B. Broderick, et John W. Peters. «Biosynthesis of complex iron-sulfur enzymes.» *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (April 2011): 319–327.
- Sheppard, K., J. Yuan, M. J. Hohn, B. Jester, K. M. Devine, et D. Soll. «From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 36 (February 2008): 1813–1825.
- Shi, Rong, et al. "Structural Basis for Fe–S Cluster Assembly and tRNA Thiolation Mediated by IscS Protein–Protein Interactions." *PLOS Biology* (Public Library of Science) 8 (April 2010): e1000354.
- Shibuya, N., Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara, et H. Kimura. «Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide.» *Journal of Biochemistry* (Oxford University Press (OUP)) 146 (July 2009): 623–626.
- Shibuya, Norihiro, et al. «3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain.» *Antioxidants & Redox Signaling* (Mary Ann Liebert, Inc., publishers) 11 (April 2009): 703–714.
- Shigi, Naoki. "Biosynthesis and Degradation of Sulfur Modifications in tRNAs." *International Journal of Molecular Sciences* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 22 (January 2021): 11937.
- Shigi, Naoki. «Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA.» *Frontiers in Genetics* (Frontiers Media SA) 5 (April 2014).
- Shigi, Naoki, Masaki Horitani, Kenryo Miyauchi, Tsutomu Suzuki, et Misao Kuroki. «An ancient type of MnmA protein is an iron-sulfur cluster-dependent sulfurtransferase for tRNA anticodons.» *RNA* (Cold Spring Harbor Laboratory) 26 (December 2019): 240–250.
- Shigi, Naoki, Tsutomu Suzuki, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, et Kimitsuna Watanabe. «Temperature-dependent Biosynthesis of 2-Thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 281 (January 2006): 2104–2113.
- Shimada, Tomohiro, Kan Tanaka, and Akira Ishihama. "Transcription factor DecR (YbaO) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli*." *Microbiology (Reading, England)* 162 (September 2016): 1698–1707.
- Singh, Amit, et al. «Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 104 (July 2007): 11562–11567.
- Singh, Sangita, Dominique Padovani, Rachel A. Leslie, Taurai Chiku, et Ruma Banerjee. «Relative Contributions of Cystathionine upbeta-Synthase and upgamma-Cystathionase to H<sub>2</sub>S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 284 (August 2009): 22457–22466.
- Smith, A. D., et al. "Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis." *Journal of the American Chemical Society* 123 (November 2001): 11103–11104.
- Sofyanovich, Olga A., Hiroaki Nishiuchi, Kazuo Yamagishi, Elena V. Matrosova, et Vsevolod A. Serebrianyi. «Multiple pathways for the formation of the upgamma-glutamyl peptides upgamma-glutamyl-valine and upgamma- glutamyl-valyl-glycine in *Saccharomyces cerevisiae*.» Édité par Marie-Joelle Virolle. *PLOS ONE* (Public Library of Science (PLoS)) 14 (May 2019): e0216622.
- Sørensen, M. A., et S. Pedersen. «Cysteine, even in low concentrations, induces transient amino acid starvation in *Escherichia coli*.» *Journal of Bacteriology* (American Society for Microbiology) 173 (August 1991): 5244–5246.
- Spallarossa, Andrea, et al. «The “Rhodanese” Fold and Catalytic Mechanism of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases: Crystal Structure of SseA from *Escherichia coli*.» *Journal of Molecular Biology* (Elsevier BV) 335 (January 2004): 583–593.
- Spry, Christina, Kieran Kirk, et Kevin J. Saliba. «Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target.» *FEMS Microbiology Reviews* (Oxford University Press (OUP)) 32 (January 2008): 56–106.

- Strour, Batoul, Sylvain Gervason, Beata Monfort, et Benoit D'Autréaux. «Mechanism of Iron–Sulfur Cluster Assembly: In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter.» *Inorganics* (MDPI AG) 8 (October 2020): 55.
- Stout, H. Lauble/M. C. Kennedy/H. Beinert/C. D. «Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound.» 1992.
- Strub, Marie-Paule, et al. «Selenomethionine and Selenocysteine Double Labeling Strategy for Crystallographic Phasing.» *Structure* (Elsevier BV) 11 (November 2003): 1359–1367.
- Sun, Lei, Mark Bartlam, Yiwei Liu, Hai Pang, et Zihao Rao. «Crystal structure of the pyridoxal-5'-phosphate-dependent serine dehydratase from human liver.» *Protein Science* (Wiley) 14 (March 2005): 791–798.
- Suvachittanont, Wallie, Yukiko Kurashima, Hiroyasu Esumi, et Mitsuhiro Tsuda. «Formation of thiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin), an effective nitrite-trapping agent in human body, in *Parkia speciosa* seeds and other edible leguminous seeds in Thailand.» *Food Chemistry* (Elsevier BV) 55 (April 1996): 359–363.
- Swift, Russell P. «The Plasmodium falciparum apicoplast cysteine desulfurase provides sulfur for both iron sulfur cluster assembly and tRNA modification.» *Elife*. 2023.
- Takahashi, Yasuhiro, et Minoru Nakamura. «Functional Assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 Gene Cluster Involved in the Assembly of Fe-S Clusters in *Escherichia coli* 1.» *The Journal of Biochemistry* 126 (November 1999): 917–926.
- Takahashi, Yasuhiro, et Umechiyo Tokumoto. «A Third Bacterial System for the Assembly of Iron-Sulfur Clusters with Homologs in Archaea and Plastids.» *Journal of Biological Chemistry* 277 (August 2002): 28380–28383.
- Taylor, Sean V., et al. «Thiamin Biosynthesis in *Escherichia coli*.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 273 (June 1998): 16555–16560.
- Tchong, Shih-I., Huimin Xu, and Robert H. White. "L-cysteine desulfidase: an [4Fe-4S] enzyme isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* that catalyzes the breakdown of L-cysteine into pyruvate, ammonia, and sulfide." *Biochemistry* 44 (February 2005): 1659–1670.
- Termaat, Martin, and Sebastian A. Leidel. "Urm1: A Non-Canonical UBL." *Biomolecules* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 11 (February 2021): 139.
- Termaat, Martin, et Sebastian A. Leidel. «The Uba4 domain interplay is mediated via a thioester that is critical for tRNA thiolation through Urm1 thiocarboxylation.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 46 (April 2018): 5171–5181.
- Thoden, James B., Hazel M. Holden, and Gregory A. Grant. "Structure of l-Serine Dehydratase from *Legionella pneumophila*: Novel Use of the C-Terminal Cysteine as an Intrinsic Competitive Inhibitor." *Biochemistry* (American Chemical Society) 53 (December 2014): 7615–7624.
- Tirupati, Bhramara, Jessica Lynn Vey, Catherine L. Drennan, and J. Martin Bollinger. "Kinetic and structural characterization of Slr0077/SufS, the essential cysteine desulfurase from *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Biochemistry* 43 (September 2004): 12210–12219.
- Tokumoto, Umechiyo, Seiichi Kitamura, Keiichi Fukuyama, and Yasuhiro Takahashi. "Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the isc and suf operons in *Escherichia coli* with the nifSU-like operon from *Helicobacter pylori*." *Journal of Biochemistry* (Oxford University Press (OUP)) 136 (August 2004): 199–209.
- Toohy, J. I. «Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role.» *Biochemical Journal* (Portland Press Ltd.) 264 (December 1989): 625–632.
- Toohy, John I. "Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane?" *Analytical Biochemistry* 413 (June 2011): 1–7.
- Toohy, John I., and Arthur J. L. Cooper. "Thiosulfoxide (Sulfane) Sulfur: New Chemistry and New Regulatory Roles in Biology." *Molecules* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) 19 (August 2014): 12789–12813.
- Torres, Adrian Gabriel, Eduard Batlle, and Lluís Ribas de Pouplana. "Role of tRNA modifications in human diseases." *Trends in Molecular Medicine* (Elsevier) 20 (June 2014): 306–314.
- Truong, Don H., Mohammad A. Eghbal, Wayne Hindmarsh, Sheldon H. Roth, et Peter J. O'textquotesingleBrien. «Molecular Mechanisms of Hydrogen Sulfide Toxicity.» *Drug Metabolism Reviews* (Informa UK Limited) 38 (January 2006): 733–744.

- Tsaousis, Anastasios D. «On the Origin of Iron/Sulfur Cluster Biosynthesis in Eukaryotes.» *Frontiers in Microbiology* 10 (2019).
- Tumbula, Debra L., Ronald A. Makula, et William B. Whitman. «Transformation of *Methanococcus marisalpinis* and identification of a PstI-like restriction system.» *FEMS Microbiology Letters* (Oxford University Press (OUP)) 121 (September 1994): 309–314.
- Umair, Muhammad, et Majid Alfadhel. «Genetic Disorders Associated with Metal Metabolism.» *Cells* 8 (December 2019): 1598.
- Vagin, Alexei A., et Michail N. Isupov. «Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps.» *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* (International Union of Crystallography (IUCr)) 57 (September 2001): 1451–1456.
- Vigorito, Carmela, et al. «Uremic Toxin Lanthionine Interferes with the Transsulfuration Pathway, Angiogenetic Signaling and Increases Intracellular Calcium.» *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI AG) 20 (May 2019): 2269.
- Vinella, Daniel, Céline Brochier-Armanet, Laurent Loiseau, Emmanuel Talla, and Frédéric Barras. "Iron-Sulfur (Fe/S) Protein Biogenesis: Phylogenomic and Genetic Studies of A-Type Carriers." *PLOS Genetics* (Public Library of Science) 5 (May 2009): e1000497.
- Vinella, Daniel, Laurent Loiseau, Sandrine Ollagnier de Choudens, Marc Fontecave, and Frédéric Barras. "In vivo [Fe-S] cluster acquisition by IscR and NsrR, two stress regulators in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* 87 (2013): 493–508.
- Visser, A., L. W. Hulshoff Pol, et G. Lettinga. «Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria.» *Water Science and Technology* (IWA Publishing) 33 (1996).
- Vo, Chi Hung, Nishu Goyal, Iftekhar A. Karimi, et Markus Kraft. «Transformation of *Methanococcus marisalpinis* and identification of a PstI-like restriction system.» *Microbiology Insights* (SAGE Publications) 13 (January 2020): 117863612094530.
- Wachnowsky, Christine, et James A. Cowan. «In Vitro Studies of Cellular Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis, Trafficking, and Transport.» Dans *Methods in Enzymology*, 55–82. Elsevier, 2017.
- Waldron, Kevin J., Julian C. Rutherford, Dianne Ford, and Nigel J. Robinson. "Metalloproteins and metal sensing." *Nature* (Nature Publishing Group) 460 (August 2009): 823–830.
- Waller, Ross F., et al. «Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 95 (October 1998): 12352–12357.
- Wang, Rui. «Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed.» *Physiological Reviews* (American Physiological Society) 92 (April 2012): 791–896.
- Wang, Yaqi, et al. «Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry.» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Frontiers Media SA) 9 (May 2021).
- Waterman, David G., Miguel Ortiz-Lombardía, Mark J. Fogg, Eugene V. Koonin, et Alfred A. Antson. «Crystal Structure of Bacillus anthracis ThiI, a tRNA-modifying Enzyme Containing the Predicted RNA-binding THUMP Domain.» *Journal of Molecular Biology* (Elsevier BV) 356 (February 2006): 97–110.
- Weber, Hans U., James F. Fleming, et Jaime Miquel. «Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine.» *Archives of Gerontology and Geriatrics* (Elsevier BV) 1 (December 1982): 299–310.
- Wehrspan, Zachary J., Robert T. McDonnell, and Adrian H. Elcock. "Identification of Iron-Sulfur (Fe-S) Cluster and Zinc (Zn) Binding Sites Within Proteomes Predicted by DeepMind's AlphaFold2 Program Dramatically Expands the Metalloproteome." *Journal of Molecular Biology* 434 (January 2022): 167377.
- Wen, Jie, Tsutomu Arakawa, et John S. Philo. «Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions.» *Analytical Biochemistry* (Elsevier BV) 240 (September 1996): 155–166.

- White, Robert H. «Origin of the labile sulfide in the iron-sulfur proteins of *Escherichia coli*.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Elsevier BV) 112 (April 1983): 66–72.
- White, Robert H. «The biosynthesis of cysteine and homocysteine in *Methanococcus jannaschii*.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* (Elsevier BV) 1624 (December 2003): 46–53.
- Whitman, William B., Jersong Shieh, Seehyang Sohn, David S. Caras, et Usha Premachandran. «Isolation and characterization of 22 mesophilic methanococci.» *Systematic and Applied Microbiology* (Elsevier BV) 7 (May 1986): 235–240.
- Williams, R. J. "The natural selection of the chemical elements." *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 53 (October 1997): 816–829.
- Wolfe, Joanna M., et Gregory P. Fournier. «Horizontal gene transfer constrains the timing of methanogen evolution.» *Nature Ecology and Evolution* (Springer Science and Business Media LLC) 2 (April 2018): 897–903.
- Wyse, Angela T. S., Mateus Grings, Moacir Wajner, and Guilhian Leipnitz. "The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models." *Neurotoxicity Research* 35 (February 2019): 484–494.
- Xia, Qiangwei, et al. «Quantitative Proteomics of the Archaeon *Methanococcus maripaludis* Validated by Microarray Analysis and Real Time PCR.» *Molecular and Cellular Proteomics* (Elsevier BV) 5 (May 2006): 868–881.
- Xu, Xiao Lan, Shawei Chen, et Gregory A. Grant. «Kinetic, mutagenic, and structural homology analysis of l-serine dehydratase from *Legionella pneumophila*.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Elsevier BV) 515 (November 2011): 28–36.
- Yacoubi, Basma El, Marc Bailly, et Valérie de Crécy-Lagard. «Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs.» *Annual Review of Genetics* (Annual Reviews) 46 (December 2012): 69–95.
- Yadav, Pramod Kumar, Kazuhiro Yamada, Taurai Chiku, Markos Koutmos, et Ruma Banerjee. «Structure and Kinetic Analysis of H<sub>2</sub>S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 288 (July 2013): 20002–20013.
- Yan, Yuetian, Gregory A. Grant, et Michael L. Gross. «Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry Reveals Unique Conformational and Chemical Transformations Occurring upon [4Fe-4S] Cluster Binding in the Type 2 l-Serine Dehydratase from *Legionella pneumophila*.» *Biochemistry* (American Chemical Society (ACS)) 54 (August 2015): 5322–5328.
- Yang, Chun-tao, Nelmi O. Devarie-Baez, Akil Hamsath, Xiao-dong Fu, et Ming Xian. «S-Persulfidation: Chemistry, Chemical Biology, and Significance in Health and Disease.» *Antioxidants and Redox Signaling* (Mary Ann Liebert Inc) 33 (November 2020): 1092–1114.
- Yasukawa, T. «Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease.» *The EMBO Journal* (Wiley) 20 (September 2001): 4794–4802.
- You, Delin, Tiegang Xu, Fen Yao, Xiufen Zhou, et Zixin Deng. «Direct Evidence that ThiI is an ATP Pyrophosphatase for the Adenylation of Uridine in 4-Thiouridine Biosynthesis.» *ChemBioChem* (Wiley) 9 (August 2008): 1879–1882.
- Zhang, Li, Wangshu Jiang, Jie Nan, Jonas Almqvist, and Yafei Huang. "The *Escherichia coli* CysZ is a pH dependent sulfate transporter that can be inhibited by sulfite." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (July 2014): 1809–1816.
- Zhang, Wanjiào, Alexander Urban, Hisaaki Mihara, Silke Leimkühler, Tatsuo Kurihara, and Nobuyoshi Esaki. "IscS Functions as a Primary Sulfur-donating Enzyme by Interacting Specifically with MoeB and MoaD in the Biosynthesis of Molybdopterin in *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier) 285 (January 2010): 2302–2308.
- Zhang, Wenting, et al. «Internal transcription termination widely regulates differential expression of operon-organized genes including ribosomal protein and RNA polymerase genes in an archaeon.» *Nucleic Acids Research* (Oxford University Press (OUP)) 51 (July 2023): 7851–7867.

- Zhang, Xiao, et Elaine Newman. «Deficiency in l-serine deaminase results in abnormal growth and cell division of *Escherichia coli* K-12.» *Molecular Microbiology* (Wiley) 69 (July 2008): 870–881.
- Zheng, Chenkang, Katherine A. Black, et Patricia C. Dos Santos. «Diverse Mechanisms of Sulfur Decoration in Bacterial tRNA and Their Cellular Functions.» *Biomolecules* (MDPI AG) 7 (March 2017): 33.
- Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack, et D. R. Dean. «Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Proceedings of the National Academy of Sciences) 90 (April 1993): 2754–2758.
- Zheng, Limin, Robert H. White, Valerie L. Cash, et Dennis R. Dean. «Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the *nifS* Gene Product.» *Biochemistry* (American Chemical Society) 33 (April 1994): 4714–4720.
- Zheng, Limin, Valerie L. Cash, Dennis H. Flint, et Dennis R. Dean. «Assembly of Iron-Sulfur Clusters.» *Journal of Biological Chemistry* (Elsevier BV) 273 (May 1998): 13264–13272.
- Zheng, Xian, Wenyu Cheng, Chendong Ji, Jin Zhang, and Meizhen Yin. "Detection of metal ions in biological systems: A review." *Reviews in Analytical Chemistry* (De Gruyter) 39 (January 2020): 231–246.
- Zhou, Jingjing, et al. "Structural Evidence for a [4Fe-5S] Intermediate in the Non-Redox Desulfuration of Thiouracil." *Angewandte Chemie International Edition* (Wiley) 60 (November 2021): 424–431.
- Zhou, Jingjing, Ornella Bimai, Simon Arragain, Ludovic Pecqueur, and Béatrice Golinelli-Pimpaneau. "TtuA and TudS, Two [4Fe-4S]-Dependent Enzymes Catalyzing Nonredox Sulfuration or Desulfuration Reactions." In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1–16. John Wiley & Sons, Ltd, 2022.
- Zivanovic, Jasmina, et al. «SELECTIVE PERSULFIDE DETECTION REVEALS EVOLUTIONARILY CONSERVED ANTI-AGING EFFECTS OF S-SULFHYDRATION.» *Cell metabolism* 30 (December 2019): 1152–1170.e13.



## **Mobilisation et incorporation enzymatique du soufre lors de réactions non-redox impliquant un centre [4Fe-4S] : Etude biochimique et structurale d'une cystéine désulfidase et d'une sulfurtransférase**

### Résumé :

Les composés soufrés, tels que la cystéine et certains cofacteurs, jouent un rôle essentiel dans les processus cellulaires. Cette thèse se concentre sur deux enzymes dépendantes d'un centre [4Fe-4S], impliquées dans le métabolisme du soufre chez l'archée anaérobie *Methanococcus maripaludis* : MmCyuA, une L-cystéine désulfidase, et MmLarE, une sulfurtransférase dépendante de l'ATP.

La première partie porte sur MmCyuA, qui catalyse la conversion de la L-cystéine en sulfure d'hydrogène et 2-aminoacrylate, ultérieurement transformé en pyruvate et ammoniac. Les structures cristallographiques de MmCyuA, que nous avons obtenues, seule et en présence de l'inhibiteur sérine ou du produit pyruvate, sont les premières structures d'une cystéine désulfidase. Ces structures ainsi que nos résultats biochimiques et analyses spectroscopiques révèlent l'aptitude de MmCyuA à lier un centre [4Fe-4S], essentiel à l'activité catalytique, via quatre cystéines, dont trois sont conservées. Nous avons proposé un mécanisme réactionnel pour la désulfuration de la cystéine impliquant la formation d'une espèce intermédiaire [4Fe-5S], de manière analogue à ce qui est décrit dans le cas de la sérine déshydratase dépendante d'un [4Fe-4S] et de la thiouracile désulfidase TudS. Des expériences comparatives de croissance de la souche sauvage de *M. maripaludis* et de la souche mutante dépourvue de l'enzyme MmCyuA soulignent l'importance de MmCyuA pour une croissance cellulaire optimale et pour permettre une croissance où la cystéine est utilisée comme unique source de soufre. Nous proposons que MmCyuA puisse transférer le sulfure lié au cluster à des accepteurs en aval des voies de biosynthèse des composés soufrés, tels que les enzymes de thiolation dépendantes d'un centre [4Fe-4S].

La deuxième partie concerne la structure et le mécanisme de MmLarE. Cette enzyme catalyse la conversion séquentielle des deux groupes carboxylates du précurseur du cofacteur de la lactate racémase en thiocarboxylates. Deux classes d'enzymes LarE existent, qui utilisent un mécanisme sacrificiel où une cystéine sert de source de soufre ou un mécanisme dépendant d'un centre [4Fe-4S]. Nous rapportons la première structure cristallographique d'une enzyme LarE [4Fe-4S]-dépendante, sous ses formes apo (sans cluster) et holo (avec cluster). La structure de holo-MmLarE montre un cluster [4Fe-4S], coordonné par trois cystéines seulement, avec le quatrième atome de fer lié à un ligand anionique (chlorure ou groupement phosphate). Ces structures, appuyées par nos études spectroscopiques, nous permettent de proposer un mécanisme dans lequel le cluster [4Fe-4S] lie un hydrogénosulfure, formant un intermédiaire [4Fe-5S]. Ce processus est similaire à celui des enzymes de thiolation de l'ARNt dépendantes d'un centre [4Fe-4S].

Mots clés : métabolisme du soufre, cystéine désulfidase, sulfurtransférase, cluster [Fe-S], structure cristallographique, mécanisme catalytique, LarE

## **Enzymatic mobilization and incorporation of sulfur during non-redox reactions involving a [4Fe-4S] cluster: Biochemical and structural study of a cysteine desulfidase and a sulfurtransferase.**

Abstract :

Sulfur-containing compounds, such as cysteine and certain cofactors, play crucial roles in cellular processes. This thesis explores the sulfur metabolism in the anaerobic archaeum *Methanococcus maripaludis*, focusing on two enzymes: L-cysteine desulfidase MmCyuA and ATP-dependent sulfur insertase MmLarE.

The first part focuses on MmCyuA, which catalyzes the decomposition of L-cysteine into hydrogenosulfide and 2-aminoacrylate, subsequently converted into pyruvate and ammonia. The crystal structures of MmCyuA that we obtained, alone and in the presence of the serine inhibitor or the pyruvate product, are the first structures of a cysteine desulfidase. These structures, together with our biochemical results and spectroscopic analysis, reveal the capacity of MmCyuA to bind a [4Fe-4S] cluster, required for activity, using four cysteines, three of which are conserved. We have proposed a reaction mechanism for cysteine desulfuration involving the formation of a [4Fe-5S] intermediate, similar to that described for the [4Fe-4S]-dependent serine dehydratase and the thiouracil desulfidase TudS. Comparative growth experiments between wild-type and CyuA-deficient *M. maripaludis* strains highlight the important role of MmCyuA for optimal growth and to enables growth using cysteine as the sole sulfur source. We propose that MmCyuA could transfer the cluster-bound sulfide to downstream acceptors, along the biosynthetic pathways of sulfurated compounds, such as [4Fe-4S]-dependent thiolation enzymes.

The second part details the structure and mechanism of MmLarE. This enzyme catalyzes the sequential conversion of the two carboxylate groups of the precursor of the lactate racemase cofactor into thiocarboxylates. Two classes of LarE enzymes exist, using a sacrificial mechanism, in which a cysteine serves as the sulfur source, or a [4Fe-4S] cluster-dependent mechanism. We present the first crystal structure of a [4Fe-4S]-dependent LarE enzyme, in both its apo (without cluster) and holo (with cluster) forms. The crystal structure of holo-MmLarE reveals a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteines only, with the fourth iron atom bound to an anionic ligand (chloride or phosphate group). These structures, along with our spectroscopic studies, support a mechanism in which the [4Fe-4S] cluster binds a hydrogenosulfide ligand, forming a [4Fe-5S] intermediate. This process is similar to that used by [4Fe-4S]-dependent tRNA thiolation enzymes.

Keywords : sulfur metabolism , cysteine desulfidase, sulfur insertase, [Fe-S] cluster, crystal structure, catalytic mechanism, LarE