

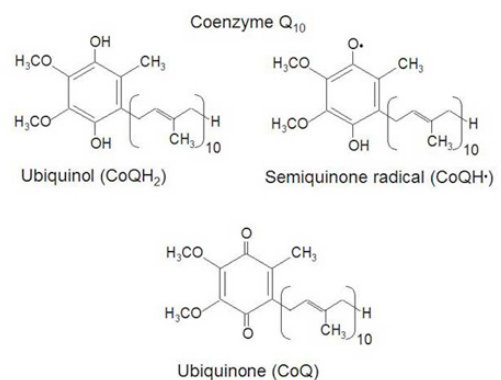
Complexe multi-protéique de biosynthèse de l'ubiquinone : études biochimiques et structurales

Responsable : Dr. Murielle Lombard

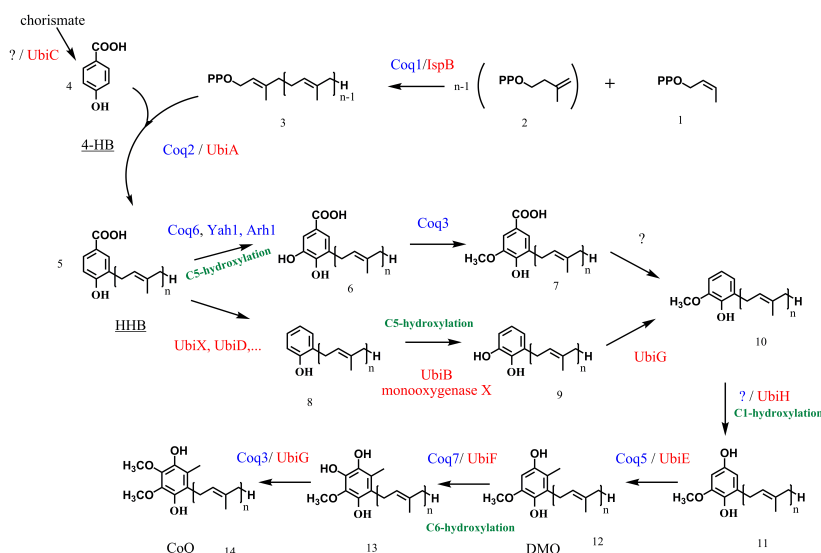
Personnel impliqué

Murielle Lombard, CR1 CNRS
Myriam Smadja, IE CDD, Collège de France
Djemel Hamdane, CR1, CNRS
Béatrice Golinelli-Pimpaneau, DR2, CNRS
Caroline Mellot-Draznieks, CR1 CNRS
Marc Fontecave, Professor au Collège de France

L'ubiquinone, ou coenzyme Q (CoQ ou Q), est un lipide de la membrane plasmique bactérienne qui assure un rôle antioxydant et de transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire. L'ubiquinone est constituée d'un noyau benzoquinone rédox-actif substitué par une chaîne polyprényle de 8 unités chez *Escherichia coli* (Q8), de 9 unités chez la levure (Q9) et de 10 unités chez l'homme (Q10). L'ubiquinone a un rôle crucial pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Chez l'homme, des déficiences primaires en CoQ ainsi que des mutations dans les gènes de sa biosynthèse ont été associées à diverses pathologies (myopathies, néphropathies, ataxies cérébelleuses, etc).

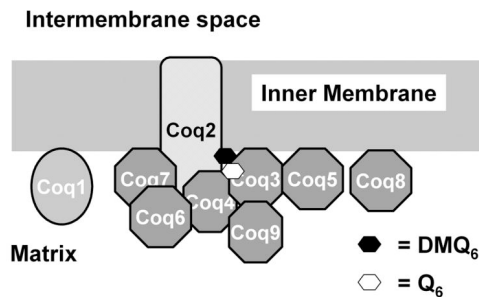


La biosynthèse de CoQ comporte plusieurs étapes de transformation de son noyau aromatique: prénylation, décarboxylation, hydroxylations, méthylations. Chez *Escherichia coli*, 9 protéines ont été identifiées à ce jour dans cette voie de biosynthèse



(ubiA-ubiH, ubiX), et des études génétiques récentes réalisées par nos collaborateurs (F. Pierrel, CEA-Grenoble ; F. Barras, Marseille) ont permis d'identifier deux nouvelles protéines, VisC et YqiC, dans la voie de biosynthèse. La fonction

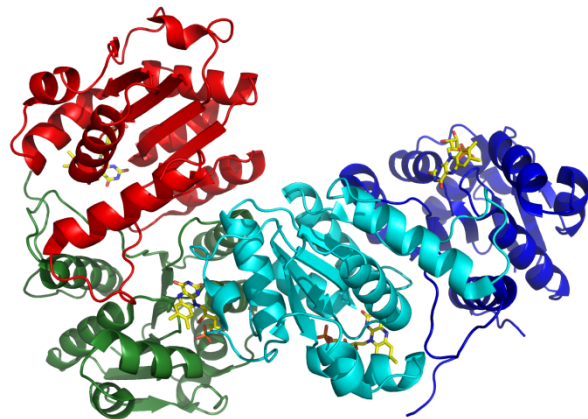
de chacune des protéines Ubi n'est à ce jour pas connue entièrement, et de très nombreuses incertitudes demeurent quant à l'identification des protéines responsables de chacune des étapes de la biosynthèse, ainsi que de l'ordre de ces réactions.



Par ailleurs, ces protéines semblent former un large assemblage multi-protéique associé à la membrane, ainsi que cela semble être le cas pour les protéines Coq impliquées dans la biosynthèse de Q₉ chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous nous intéressons à l'ensemble des protéines de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez *Escherichia coli* d'un point de vue structural et fonctionnel. Nous cherchons à déterminer de façon précise la fonction exacte de chacune des protéines ou enzymes qui constituent ce complexe multi-protéique. La caractérisation biochimique *in vitro* des protéines Ubi et la détermination de leur structure tridimensionnelle devraient permettre de mieux comprendre leur fonction, et leur mécanisme au niveau moléculaire. Nous cherchons aussi à déterminer leur mode de structuration en un complexe de haut poids moléculaire (composition exacte de ce complexe, taille et stoechiométrie, localisation cellulaire) et leur ancrage hydrophobe à la membrane.

De façon intéressante, des alignements de séquence suggèrent que VisC serait une monooxygénase flavine-dépendante par homologie avec les protéines UbiF et UbiH, deux enzymes vraisemblablement impliquées dans des réactions d'hydroxylation de la voie de biosynthèse de Q. Par ailleurs, les deux enzymes qui semblent être responsable de la réaction de décarboxylation, UbiD et UbiX, présentent chacune dans leur séquence un motif de liaison aux flavines, et une étude cristallographique récente a confirmé la présence de FMN dans la structure de UbiX (figure ci-contre, structure cristallographique de UbiX de *Pseudomonas aeruginosa*, code PDB, 3ZQU).



Nous voulons avoir une meilleure connaissance au niveau fondamental de la voie de biosynthèse de CoQ chez *E. coli*. Pour cela, nous utilisons une combinaison d'approches multi-disciplinaires de biochimie, de biophysique moléculaire (spectroscopie sous pression, transfert d'énergie par résonance FRET, dichroïsme circulaire, laser flash photolyse, Djemel Hamdane) et de biologie structurale (cristallographie RX, Béatrice Golinelli-Pimpaneau) dont nous disposons au sein de l'unité.

Méthodes et expertises

- Cultures cellulaires : bactéries (*E. coli*), levures (*S. cerevisiae*), eucaryotes (cellules humaines)
- Clonage, expression de protéines recombinantes procaryotes ou eucaryotes, mutagenèse dirigée
- Technologies SNAP tag et TAP tag
- Purification de protéines
- Enzymologie
- Spectroscopies optiques (UV-visible, fluorescence)
- Caractérisation de produits de métabolisme par spectrométrie de masse
- Modélisation moléculaire : modélisation de protéines par homologie, docking, dynamique moléculaire

Collaborations principales

- Fabien Pierrel, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5249, CEA-CNRS, Grenoble
- Frédéric Barras, Laboratoire de Chimie Bactérienne, UPR 9043, CNRS, Marseille

Rattachement

L'équipe est rattachée à l'école doctorale ED 387 : iViv, interdisciplinaire du vivant, de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI.

Lien

CoQ, équipe Biocat LCBM, CEA-Grenoble, Fabien Pierrel

http://www-dsv.cea.fr/instituts/institut-de-recherches-en-technologies-et-sciences-pour-le-vivant-irtsv/unites/chimie-et-biologie-des-metaux-cbm/equipe-biocatalyse/formation-des-centres-binucleaires-a-fer-et-biosynthese-du-coenzyme-q#anchor_CoQ

Publications représentatives

2012

Relative Enzymatic Activity Levels from In Silico Mutagenesis (REALISM). Mellot-Draznieks C. Submitted to Journal of the American Chemical Society.

2011

Cobalt stress in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: molecular bases for toxicity and resistance. Barras F, Fontecave M. Metallomics. 2011 Nov;3(11):1130-4.

Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. Ozeir M, Mühlenhoff U, Webert H, Lill R, Fontecave M, Pierrel F. Chem Biol. 2011 Sep 23;18(9):1134-42.

Intermolecular electron transfer in two-iron superoxide reductase: a putative role for the desulforedoxin center as an electron donor to the iron active site. Bonnot F, Duval S, Lombard M, Valton J, Houée-Levin C, Nivière V. J Biol Inorg Chem. 2011 Aug;16(6):889-98.

Methylations: a radical mechanism. Fontecave M. Chem Biol. 2011 May 27;18(5):559-61. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.001.

Clinical and biochemical heterogeneity associated with fumarase deficiency. Ottolenghi C, Hubert L, Allanore Y, Brassier A, Altuzarra C, Mellot-Draznieks C, Bekri S, Goldenberg A, Veyrieres S, Boddaert N, Barbier V, Valayannopoulos V, Slama A, Chrétien D, Ricquier D, Marret S, Frebourg T, Rabier D, Munnich A, de Keyzer Y, Toulhoat H, de Lonlay P. Hum Mutat. 2011 May 10. doi: 10.1002/humu.21534.

A new cytochrome P450 belonging to the 107L subfamily is responsible for the efficient hydroxylation of the drug terfenadine by *Streptomyces platensis*. Lombard M, Salard I, Sari MA, Mansuy D, Buisson D. Arch Biochem Biophys. 2011 Apr 1;508(1):54-63.

2010

Biooxidation of methyl group: Part 2. Evidences for the involvement of cytochromes P450 in microbial multistep oxidation of terfenadine. El Ouarradi A, Lombard M, Buisson D. J Mol Catal B. 2010;67(3-4): 172-178.

Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Mühlenhoff U, Ozeir M, Lill R, Fontecave M. Chem Biol. 2010 May 28;17(5):449-59.