

Projet 2 : Complexe multi-protéique de biosynthèse de l'ubiquinone: études biochimiques et structurales

Responsable : Dr. Murielle Lombard, coordinateur de l'ANR PHEYDR (2024-2027)

Permanents impliqués dans le projet (01/10/23):

Dr. Murielle Lombard (CRCN CNRS), Dr. Philippe Simon (IRCN CNRS), Bruno Faivre (IE CDF) and Pr. Marc Fontecave (Pr CDF)

L'ubiquinone, ou coenzyme Q (CoQ ou Q), est un lipide de la membrane plasmique bactérienne qui assure un rôle de transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire ainsi qu'un rôle antioxydant. L'ubiquinone est constituée d'un noyau benzoquinone rédox actif substitué par une chaîne polyisoprényle de 8 unités chez *Escherichia coli* (Q8), de 9 unités chez la levure (Q9) et de 10 unités chez l'homme (Q10) (Fig. 1). 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).

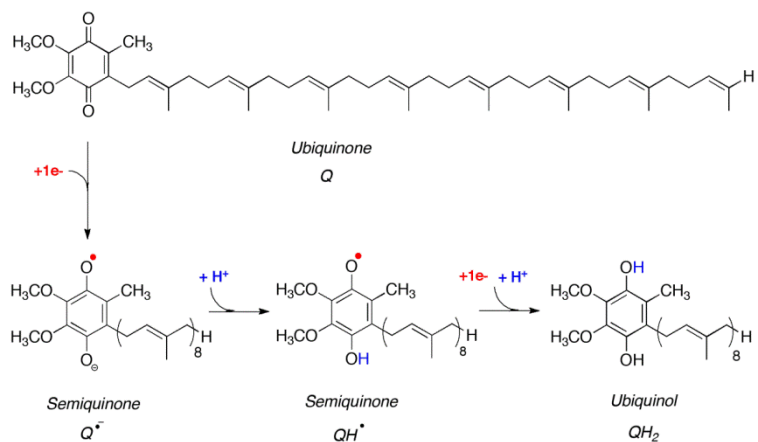


Fig. 1 : Structure de l'ubiquinone et de ses différents états redox

La biosynthèse de CoQ comporte plusieurs étapes de transformation de son noyau aromatique: une réaction de prénylation, une décarboxylation, trois hydroxylations, et trois méthylations (Fig. 2). Chez *Escherichia coli*, 9 protéines ont été identifiées à ce jour dans cette voie de biosynthèse (ubiA-ubiI, ubiX), et des études génétiques réalisées par nos collaborateurs (F. Pierrel, UJF-Grenoble ; F. Barras, Marseille) ont permis d'identifier 3 nouvelles protéines : VisC (Ubil), YigP (UbiJ) et YqjC (UbiK), toutes trois impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone. Cette voie de biosynthèse est bien conservée des procaryotes jusqu'à l'homme.

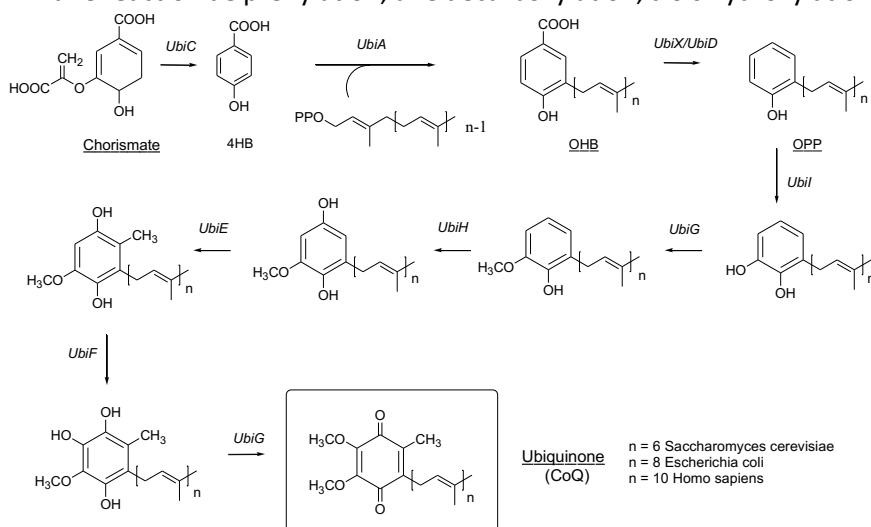


Fig. 2 : Voie de biosynthèse de l'ubiquinone proposée chez *E. coli*

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, qui sont les protéines homologues des Ubi bactériennes, et qui sont impliquées dans la biosynthèse du CoQ9 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 3).

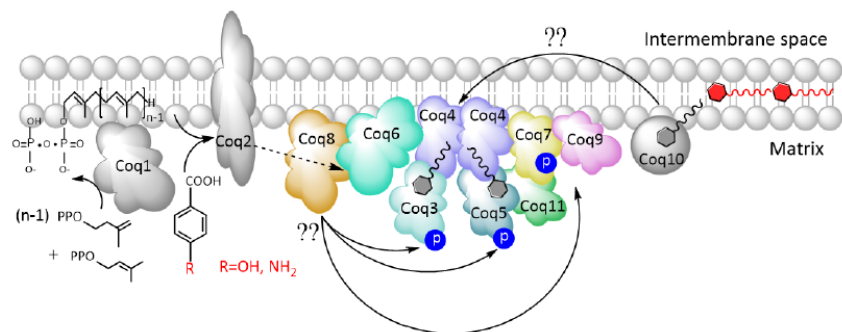


Fig. 3 : Modèle proposé du complexe de biosynthèse du CoQ chez la levure *S. cerevisiae* (Clarke CF, J Biol Chem, 2014).

En dépit de l'importance physiologique de l'ubiquinone dans la chaîne de transfert d'électrons et l'implication dans les pathologies décrites ci-dessus, 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. Nous avons également peu d'informations biochimiques concernant la spécificité de substrat ou les mécanismes réactionnels de ces enzymes. Ceci est partiellement dû au fait que les substrats de ces enzymes sont des composés lipophiles très hydrophobes, peu solubles dans l'eau, et peu facile d'accès. De plus, l'obtention de données physico-chimiques *in vitro* sur des systèmes enzymatiques faisant partie d'un complexe multi-protéique *in vivo* peut être délicat.

Au laboratoire, 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 stœchiométrie, localisation cellulaire) et leur ancrage hydrophobe à la membrane (collaboration F. Pierrel, UMR5163, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UJF-Grenoble). Notre objectif est d'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 multidisciplinaires de biochimie, biophysique moléculaire (spectroscopie sous pression, transfert d'énergie par résonance FRET, dichroïsme circulaire, laser flash photolyse, Djemel Hamdane) biologie structurale (cristallographie RX, Ludovic Pecqueur) et chimie organique (Philippe Simon) dont nous disposons au sein de l'unité.

Nous nous sommes aussi lancé dans la synthèse d'analogues de biosynthèse de l'ubiquinone, à chaînes plus courtes possédant 3 unités terpéniques (farnésyl) au lieu de 8 (ubiquinone UQ8).

● **Etude biochimique et structurale des flavoprotéines UbiI d'*E.coli* et de Coq6 de *Saccharomyces cerevisiae***

Nous avons étudié **UbiI**, l'enzyme qui catalyse la réaction d'hydroxylation en C5 du 2-octaprenyl phenol (OPP). UbiI présente 30% d'identité de séquence avec UbiF et UbiH, deux autres protéines de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, et qui catalysent elles-mêmes chacune une réaction d'hydroxylation du noyau aromatique (C1 pour UbiH et C6 pour UbiF). L'étude des séquences de ces trois enzymes (UbiI, UbiF et UbiH) montre qu'elles appartiennent toutes à la famille des mono-oxygénases à flavine. Nous avons purifié une forme instable d'UbiI qui avait une forte tendance à l'agrégation. Après protéolyse limitée, nous avons obtenu une forme apo (sans FAD), parfaitement soluble et tronquée de 35 acides aminés au niveau C-terminal. Nous avons réussi à obtenir des cristaux de cette forme apo et tronquée d'UbiI et nous avons déterminé la **structure tridimensionnelle** de l'enzyme par diffraction de RX (2 Å résolution, code PDB 4K22). Cette enzyme partage de fortes similarités structurales avec une protéine de la famille des mono-oxygénases à flavine, la pHBH (p-Hydroxybenzoate hydroxylase) (Fig. 4). Ceci constitue le premier exemple de la structure d'une hydroxylase Ubi.

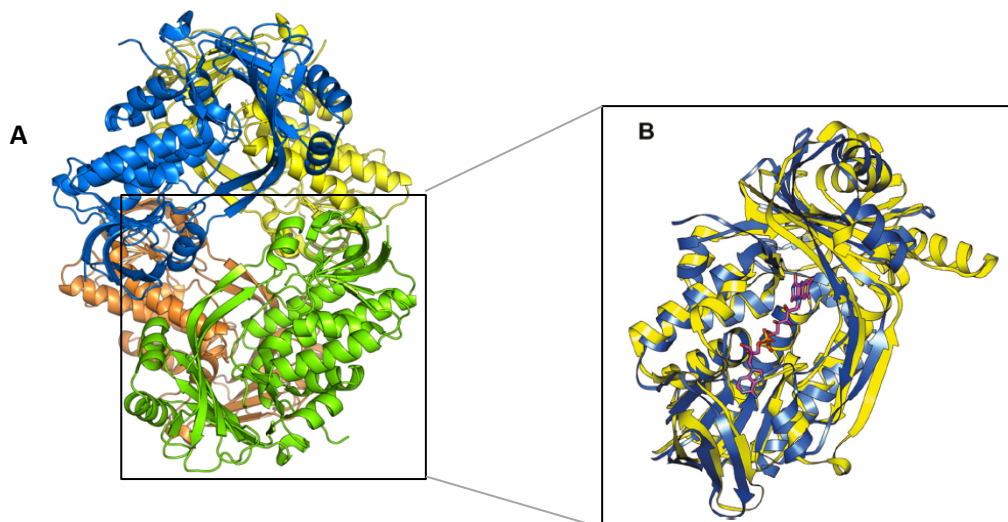
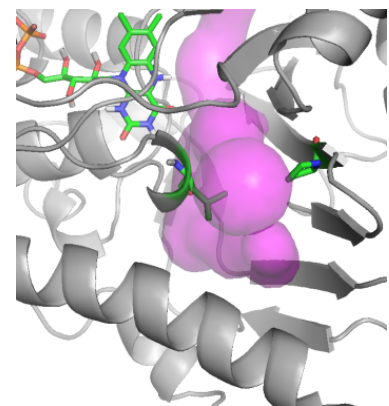


Fig. 4: A) **Structure tridimensionnelle aux RX d'UbiI tronquée et apo d'*E.coli*** (code PDB 4K22) et B) **superposition d'UbiI (bleue) avec PHBH (jaune)**, code PDB 1PBE (Hajj Chehade, 2014).

Nous avons également réalisé une étude de modélisation moléculaire par homologie de Coq6 dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme. Cette étude nous a permis, par des calculs de dynamique moléculaire et de docking, de mettre en évidence trois voies d'accès potentielles des substrats (Fig. 5).

Fig. 5 : **Modèle proposé de site actif de Coq6p de *saccharomyces cerevisiae*** (FAD en vert) avec un tunnel d'accès potentiel du substrat en violet (Caver).



De plus, des études enzymologiques concernant Coq6p de *Saccharomyces cerevisiae*, nous ont permis de montrer que l'activation du FAD se fait via un système ferrédoxine/ferrédoxine réductase.

● Etude biochimique et structurale des protéines de structure UbiJ et UbiK d'*E.coli*

Nous avons entrepris l'étude biochimique et structurale de deux protéines nouvellement identifiées par nos collaborateurs, **UbiJ** et **UbiK**, et dont les fonctions biologiques sont jusqu'à ce jour inconnues. Des études antérieures ont montré qu'UbiK de *Salmonella typhimurium* permet l'agrégation de liposomes *in vitro*, suggérant une activité fusogénique de membrane. UbiK présente 31% d'identité de séquence avec Brick1, une protéine d'assemblage du complexe Wave du cytosquelette, ce qui laisse à penser qu'UbiK pourrait avoir un rôle de **protéine scaffold**, ayant un rôle important pour la formation, la structuration et la stabilité du complexe Ubi. Nous avons montré au laboratoire qu'**UbiK forme un complexe protéique avec UbiJ**, une protéine présentant des homologies de séquence avec les protéines de la famille SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) qui sont capables de lier des lipides.

Nous avons récemment obtenu **la structure du domaine SCP2 d'UbiJ à 1.7 Å de résolution**. Le domaine SCP2 est un dimère formé de 5 hélices α et de 5 feuillets β , avec une **cavité hydrophobe** dont le plancher est constitué par les feuillets β et les parois formées par les hélices α . La géométrie et la taille de la cavité sont en cohérence avec **la liaison des intermédiaires lipidiques** de la biosynthèse de l'ubiquinone (Fig. 6).



Fig. 6 : Structure du domaine SCP2 d'UbiJ d'*E.coli* (1.7 Å). A) Dimère de UbiJ-SCP2 avec un fold de type α/β . B) Les sphères jaunes représentent la cavité hydrophobe au sein du dimère UbiJ. C) Modèle de la cavité d'UbiJ-SCP2 avec les résidus hydrophobes bordant la cavité mis en évidence en jaune et montrant une densité électronique non modélisée suggérant un site de liaison des lipides intermédiaires de l'ubiquinone.

● Mise en évidence d'un méga complexe multi-protéique de 1.2M Da de 7 protéines Ubi

Avec nos collaborateurs, nous avons démontré que la protéine UbiJ est une protéine centrale pour la stabilisation d'un méga complexe Ubi qui se trouve dans la fraction cytosolique. Ce mégacomplexe comporte 7 protéines dont 5 enzymes (UbiE, UbiF, UbiG, UbiH, UbiI) et 2 protéines « scaffold » (UbiK et UbiJ). Ce complexe se trouve dans la fraction cytosolique, et non membranaire. Nous avons également montré que des intermédiaires de synthèse, tels que l'OPP et la DMQ8, s'accumulent dans ce complexe, alors que peu de UQ8 se trouve dans ce complexe.

Ainsi, nous pouvons proposer un modèle pour le complexe Ubi dans lequel les intermédiaires de biosynthèse de l'UQ8 qui se trouvent en amont de l'OPP ne sont pas associés aux lipides membranaires mais à UbiJ au niveau du cytosol dans le large complexe Ubi (Fig. 6). Dans ce modèle l'extrusion de l'OPP de la membrane plasmique pourrait être médiée par la protéine UbiB. En effet, récemment Coq8, l'homologue eucaryote d'UbiB, a été postulé comme étant capable de coupler l'hydrolyse de l'ATP à l'extrusion des têtes polaires d'intermédiaires de l'UQ8 hors de la membrane. Il est intéressant de noter que UbiB contient un segment transmembranaire et une partie soluble et que cette protéine ne fait pas partie du complexe Ubi.

Les résultats obtenus permettent ainsi d'établir clairement l'existence d'un métabolite stable pour la biosynthèse de l'ubiquinone (Fig. 7).

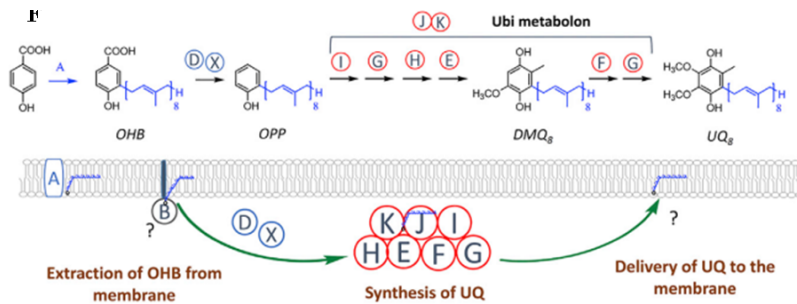


Fig. 7 : Voie de biosynthèse de l'UQ₈ et modèle proposé d'organisation physique des protéines Ubi et des intermédiaires prénylés de l'UQ₈ par rapport à la membrane interne. UbiB facilite l'extraction de l'OHB de la membrane et l'OHB est ensuite décarboxylé en OPP par UbiD-X. L'OPP est liée par UbiJ dans le complexe Ubi et le métabolite formé par les sept protéines Ubi encerclées en rouge synthétise l'UQ₈, qui est finalement délivré à la membrane, où elle réalise ses fonctions physiologiques.

● Etude biochimique et structurale des protéines Fe-S UbiU et UbiV impliquées dans la biosynthèse anaérobie de l'ubiquinone chez *E. coli*

Nous avons montré que les voies de biosynthèse de l'ubiquinone dépendantes et indépendante de l'oxygène ne diffèrent que par trois étapes d'hydroxylation, et nous avons identifié trois gènes : *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*, qui sont essentiels pour la biosynthèse de l'ubiquinone en absence de l'oxygène chez *E. coli*.

L'expression, la purification et la caractérisation spectroscopique d'UbiV et du complexe hétérodimère UbiU-UbiV ont clairement montré que chaque protéine contenait un centre [4Fe-4S]. UbiU et UbiV forment un complexe hétérodimerique, suggérant que ces deux protéines fonctionnent ensemble (Fig. 8).

Le rôle des centres Fe-S dans UbiU et UbiV est inconnu à ce stade. Notre hypothèse de travail actuelle est qu'ils joueraient un rôle de chaînes de transfert d'électrons entre le substrat (l'intermédiaire biosynthétique de l'ubiquinone à hydroxyler) et un accepteur d'électrons non identifié nécessaire à l'activation du substrat. Ensemble, nos résultats identifient UbiU et UbiV comme des prototypes d'une nouvelle classe d'hydroxylases indépendantes de l'oxygène et ouvrent une nouvelle porte pour l'étude des réactions d'hydroxylation indépendante de l'oxygène.

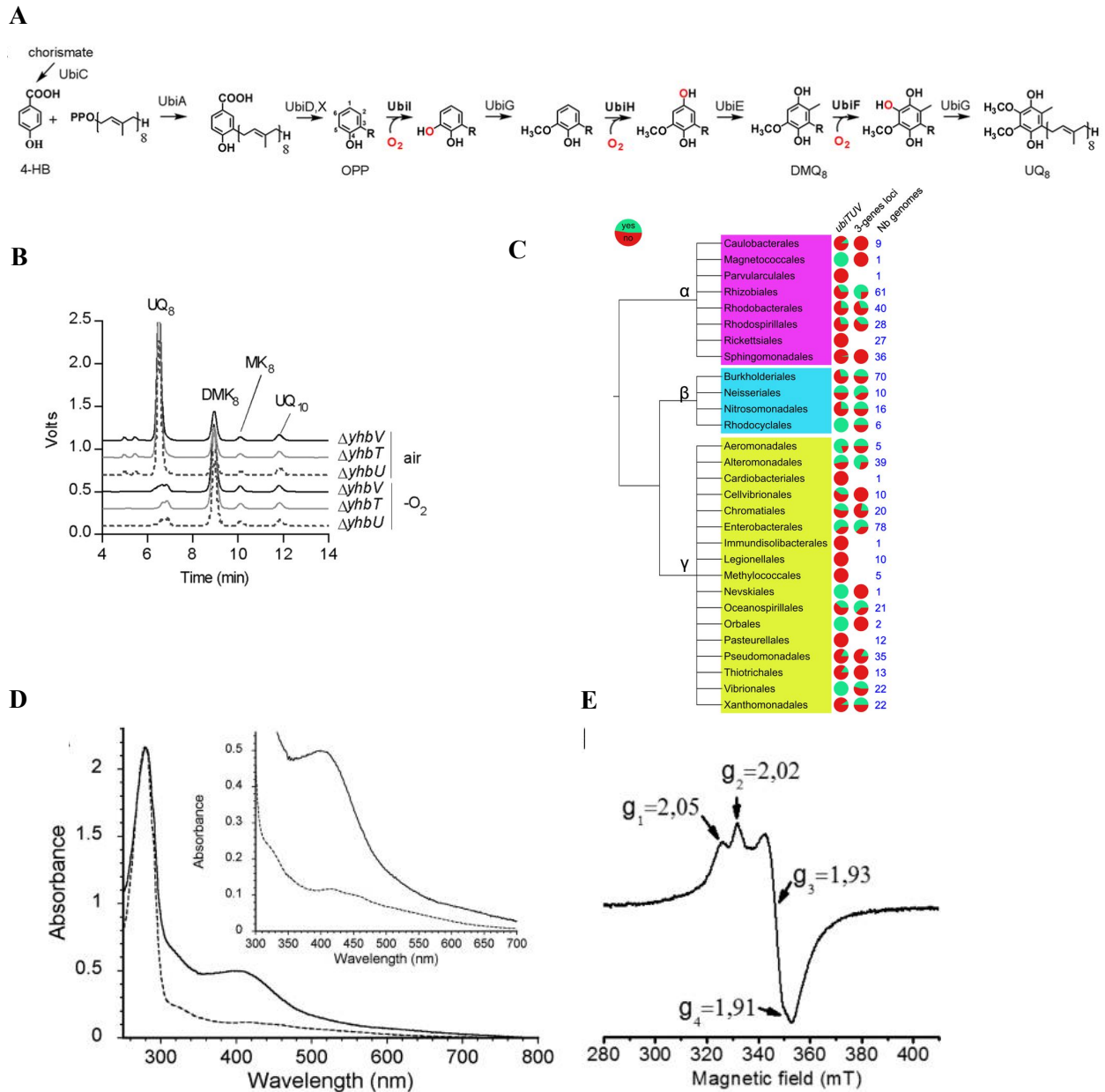


Fig. 8 : A) **Voies de Biosynthèse aérobie et anaérobie de l'ubiquinone dépendante.** Les protéines UbiU UbiV et UbiT interviennent en lieu et place des hydroxylases aérobie flavine dépendantes UbiI, UbiF et UbiH (notées en rouge ici). B) Analyse par HPLC-ECD des extraits lipidiques des souches dont les gènes *ubiU*, *ubiV* et *ubiT* ont été délétés et cultivés à l'air ou en anaérobie. C) Occurrence des gènes *ubiU*, *V* et *T* dans 600 génomes de protéobactéries. D) Spectre d'absorption UV-visible du complexe UbiU-UbiV d'*E.coli*. E) Spectre RPE du complexe UbiU-UbiV d'*E.coli*.

● **Le préphénate est le donneur organique d'atome d'oxygène dans la biosynthèse anaérobie de l'ubiquinone**

Des études génétiques menées par nos collaborateurs à Grenoble ont montré que la biosynthèse anaérobie de l'ubiquinone est dépendante de la voie *aro* chez *E. coli*. De plus, des souches déficientes dans leur capacité à synthétiser du préphénate (souches $\Delta pheA \Delta tyrA$) ne sont plus capables de synthétiser de l'ubiquinone en anaérobie (Fig. 9).

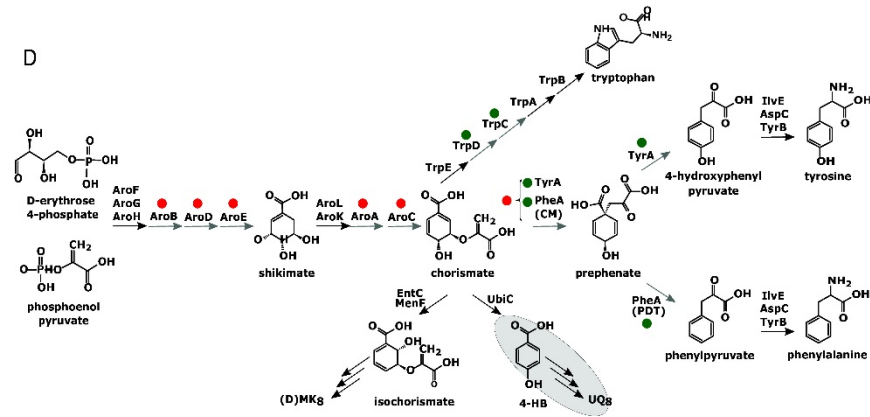


Fig. 9: Voie métabolique *aro* des acides aminés aromatiques chez *E. coli*. Les ronds rouge et vert indiquent respectivement les protéines essentielles ou non indispensables pour la biosynthèse anaérobie de l'ubiquinone.

Nous avons émis l'hypothèse que le préphénate était le donneur d'atome d'oxygène pour les étapes d'hydroxylations anaérobies de la voie anaérobie (Fig. 10). Au laboratoire, un précurseur chimiquement stable du préphénate, le shikimate, a été synthétisé sous forme marquée à l'oxygène 18, sur le groupement hydroxyl -OH en position 4 du shikimate. Nous avons montré par spectrométrie de masse que cet atome d'oxygène était inséré dans l'ubiquinone en conditions anaérobies.

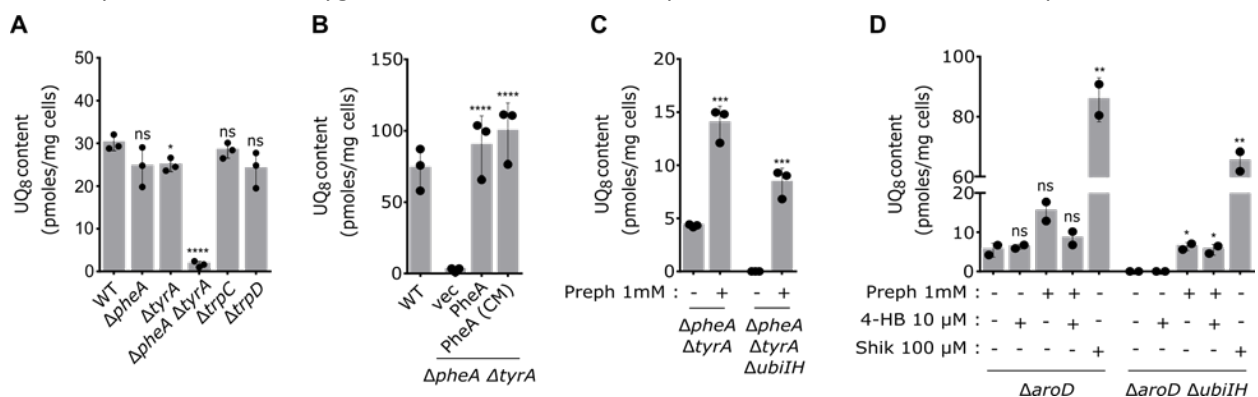


Fig. 10: Le préphénate est nécessaire pour la biosynthèse indépendante de l'O₂ de l'ubiquinone.

Les souches *E. coli* indiquées ont été cultivées en anaérobiose dans des milieux LB (A-B) ou MOPS (C-D). Teneur en UQ8 dans les mutants en aval du chorismate (A), dans le double mutant $\Delta pheA \Delta tyrA$ contenant soit pTet (*vec*), pTet-*pheA* (*PheA*) ou pTet-*pheA*-CM (*PheA* (CM)) (B), dans les souches double mutant $\Delta pheA \Delta tyrA$ et quadruple mutant $\Delta pheA \Delta tyrA \Delta ubiH$ supplémentées ou non avec 1mM de préphénate (Preph) (C), dans les souches $\Delta aroD$ et $\Delta aroD \Delta ubiH$ supplémentées avec 1 mM de préphénate et/ou 10 μ M de 4-HB et/ou 100 μ M de shikimate (Shik) (D).

● **Synthesis and biological evaluation of small molecules derived from shikimate and prephenate**

Le système enzymatique UbiU/UbiV n'est présent que chez les bactéries, et pas chez les animaux. Et nous avons montré que ce système est impliqué dans la pathogénicité de certaines bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*. Nous visons maintenant à synthétiser des inhibiteurs potentiels qui ciblent ce système enzymatique. Nous espérons concevoir des inhibiteurs sélectifs de *Pseudomonas aeruginosa*.

Méthodes et expertises

- Cultures cellulaires : bactéries (*E. coli*)
- Clonage, expression de protéines recombinantes procaryotes ou eucaryotes, mutagénèse dirigée, purification de protéines
- Enzymologie
- Spectroscopies optiques (UV-visible, fluorescence)
- Caractérisation de produits de métabolisme par spectrométrie de masse
- Etude cristallographique de protéines
- Synthèse organique

Collaborations principales

- Dr. Fabien Pierrel, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UMR 5163, CNRS, UJF-Grenoble
- Pr. Ludovic Pelosi, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UMR 5163, CNRS, UJF-Grenoble
- Pr. Frédéric Barras, Unité Adaptation au Stress et Métabolisme chez les entérobactéries, Département de Microbiologie, Institut Pasteur.
- Dr. Martial Ray, Spectrométrie de masse pour la Biologie, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur.

Publications

14- An organic O donor for biological hydroxylation reactions

Kazemzadeh, K, Simon, P, Pelosi, L, Séchet, E, Arulanandam, R, Hajj Chehade, M, Rey, M, Onal, D, Flandrin, L, Chreim, R, Faivre, B, Vo, CDT, Arias-Cartin, R, Barras, F, Fontecave, M, Bouveret, E, Lombard, M, Pierrel F

PNAS, **2024**, 121(13):e2321242121

13- Activation of Coq6p, a FAD monooxygenase involved in coenzyme Q biosynthesis, by adrenodoxin reductase/ferredoxin

Gonzalez, L, Vo, CDT, Faivre, B, Pierrel, F, Fontecave, M, Hamdane, D, Lombard, M

Chembiochem, **2024**, 25(5):e202300738

12- The O₂-independent pathway of ubiquinone biosynthesis is essential for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*

Vo, CDT, Michaud, J, Elsen, S, Faivre, B, Bouveret, E, Barras, F, Fontecave, M, Pierrel, F, Lombard, M, Pelosi, L.

J Biol Chem. **2020**, 295: 9021-. doi: 10.1074/jbc.RA120.013748

11- Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway.

Pelosi L, Vo CD, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Goussé M, Chenal C, Touati N, Binet L, Cornu D, Fyfe CD, Fontecave M, Barras F, Lombard M, Pierrel F.

MBio, **2019** Jul 9; 10(4). E01319-19

10- A soluble metabolon synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone

Hajj Chehade M, Pelosi L, Fyfe C, Loiseau L, Rascalou B, Brugière S, Kazemzadeh K, Vo CDT, Aussel L, Couté Y, Ciccone, L, Fontecave M, Barras F, Lombard M, Pierrel F.

Cell Chem Biol, **2019** Apr 18; 26(4): 482-492

9- The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ

Loiseau L, Fyfe C, Aussel L, Hajj Chehade M, Hernández SB, Faivre B, Hamdane D, Mellot-Draznieks C, Rascalou B, Pelosi L, Velours C, Cornu D, Lombard M, Pierrel F, Fontecave M, Barras F.

J Biol Chem. **2017** Jul 14; 292(28):11937-11950

8- Coenzyme Q Biosynthesis: Evidence for a Substrate Access Channel in the FAD-Dependent Monooxygenase Coq6

Ismail, A., Leroux, V., Smadja, M., Gonzalez, L., Lombard, M., Pierrel, F. Mellot-Draznieks, Fontecave, M.

PLoS Comput Biol **2016** Jan; 12(1):e1004690

7- Coq6 is responsible for the C4-deamination reaction in coenzyme Q biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.

Ozeir M, Pelosi L, Ismail A, Mellot-Draznieks C, Fontecave M, Pierrel F.

J Biol Chem. **2015** Oct 2 ; 290(40) : 24140-51.

6- Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria.

Aussel L, Pierrel F, Loiseau L, Lombard M, Fontecave M, Barras F.

Biochim Biophys Acta. **2014** Jul; 1837(7):1004-11

5- ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Aussel L, Loiseau L, Hajj Chehade M, Pocachard B, Fontecave M, Pierrel F, Barras F.

J Bacteriol. **2014** Jan, 196(1):70-9

4- ubiL, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation

Hajj Chehade M, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M, Golinelli-Pimpaneau B, Mellot-Draznieks C, Hamelin O, Aussel L, Kieffer-Jaquinod S, Labessan N, Barras F, Fontecave M, Pierrel F.

J Biol Chem. **2013** Jul; 288(27):20085-92

3- Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway

Xie LX, Ozeir M, Tang JY, Chen JY, Jaquinod SK, Fontecave M, Clarke CF, Pierrel F.

J Biol Chem. **2012** Jul 6; 287(28):23571-81

2- 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

1- 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