

# THESE

Présentée par

**Eric ELLEINGAND**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR  
DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER- GRENOBLE I**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité : **CHIMIE MOLECULAIRE**

---

**REACTIVITE DU RADICAL TYROSINYLE**

**DE LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE :**

**APPLICATION A LA RECHERCHE DE NOUVEAUX**

**INHIBITEURS**

---

Soutenue le 20 juillet 1998 à l'Université Joseph Fourier de Grenoble  
devant le Jury composé de :

<b>Mrs LEPOIVRE M.</b>	Rapporteur
<b>UN S.</b>	Rapporteur
<b>SUBRA R.</b>	Examineur
<b>GEREZ C.</b>	Examineur
<b>FONTECAVE M.</b>	Examineur

Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, dans l'équipe de Chimie Bioinorganique LEDSS V, UMR C5616  
CNRS-Université Joseph Fourier-Grenoble  
et au Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biochimiques,  
DBMS-CEA/CNRS/Université Joseph Fourier-Grenoble

*A ma famille*

*J'aimerai tout d'abord remercier chaleureusement le professeur Marc FONTECAVE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens ici à rendre hommage à sa compétence et surtout à la grande lucidité scientifique dont il a fait preuve tout au long du suivi de cette thèse.*

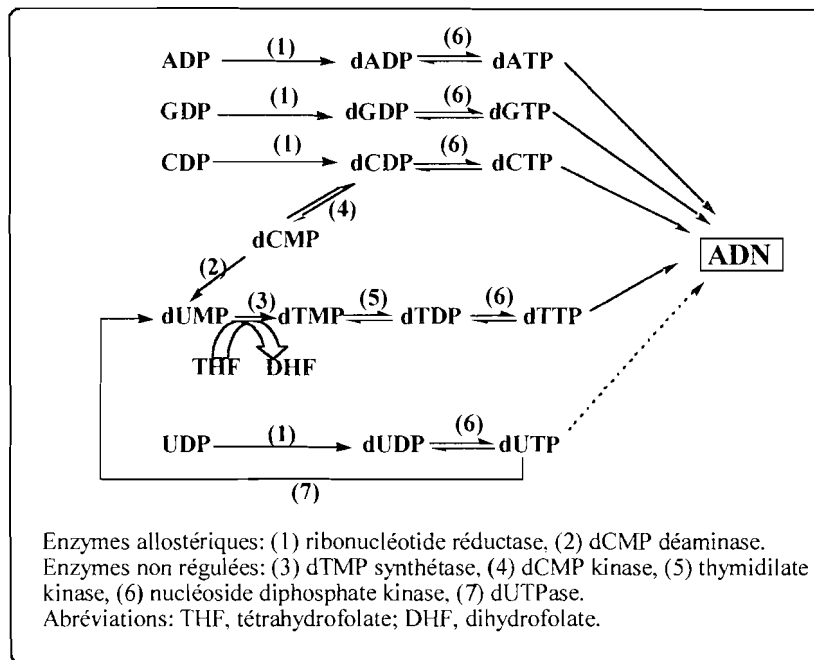
*Je tiens également à témoigner ma sincère reconnaissance au Docteur Catherine GEREZ (maintenant Mme Carlos Petit) pour sa disponibilité et la compétence dont elle a fait preuve envers moi. Elle a guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche, et m'a surtout appris la rigueur dans la démarche scientifique. Je sais qu'elle a fait preuve de beaucoup de patience pendant ces quatre longues années.*

*Tous mes remerciements à Messieurs Michel LEPOIVRE, Sun UN et Robert SUBRA pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.*

*Je tiens bien sûr à exprimer toute ma sympathie à tous les membres du laboratoire sans oublier mes anciens collègues de bureau Joan RIERA et Nelly MINGUEZ (moumoune) et surtout à Murielle LOMBARD.*

*Enfin, en vrac, j'aimerai dire grand merci à tous les membres du Leo club grenoble Champollion pour leur soutien constant, et à Philippe VALENZA pour l'aide appréciable qu'il m'a apporté lors de la frappe de cette thèse.*

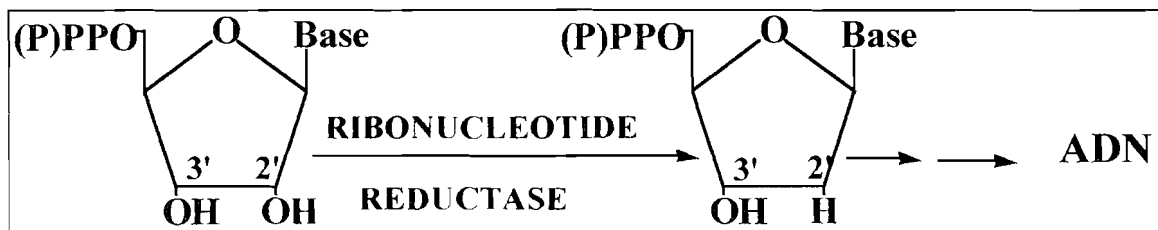
## INTRODUCTION GENERALE



**Figure 1** : Voie de synthèse de novo des désoxyribonucléotides.

La biosynthèse de l'ADN dépend de la concentration dans l'organisme de ces quatre désoxyribonucléotides.

La réaction enzymatique catalysée par la RNR, illustrée par la figure 2, a été caractérisée pour la première fois dans *Escherichia coli* dans les années 1960 par Reichard et Rutberg, 1960. Ce fut le point de départ d'un nouveau champ de recherche qui s'est énormément développé ces dernières années, offrant constamment de nouveaux challenges dans les domaines de la recherche biomédicale et métabolique.



**Figure 2** : La réaction catalysée par la ribonucléotide réductase.

### I. L'ADN ET LES RNRs : HISTORIQUE ET IMPORTANCE.

L'**acide désoxyribonucléotique (ADN)** est une substance essentielle à la plupart des organismes vivants, car il porte en son sein l'information héréditaire qui détermine la structure des protéines. Etant donné la diversité des séquences, l'ADN est à la base du processus d'évolution qui a généré plusieurs millions de différentes formes de vie sur terre, depuis le premier organisme vivant apparu il y a 3 à 4 milliards d'années.

Le programme génétique, comprenant tous les éléments nécessaires à l'existence et au bon fonctionnement d'une cellule vivante, est entièrement contenu dans l'ADN. Cette base de données de l'information génétique est composée de quatre éléments de base : les désoxyribonucléotides (dNTPs) dATP, dTTP, dGTP, dCTP qui sont liés entre eux par l'ADN polymérase pour former une chaîne d'ADN.

La voie principale de biosynthèse des dNTPs est celle nommée “ de novo ” dans laquelle ces précurseurs de la synthèse et de la réplication de l'ADN sont formés directement, en une seule étape à partir de la réduction des ribonucléotides (NTPs) correspondants. Cette réaction clef est catalysée, dans tous les organismes vivants, par la **ribonucléotide réductase (RNR)** (figure 1).

**INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

---

## SOMMAIRE

---

II- RESULTATS _____	164
II-1- Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 d' <i>A. thaliana</i> et R2 de souris par le resvératrol. _____	164
II-2- Inhibition de l'activité ribonucléotide réductase par le resvératrol. _____	167
II-3 Inhibition de la synthèse d'ADN par le resvératrol. _____	168
II-4 Inhibition de la croissance cellulaire d' <i>A thaliana</i> par le resvératrol. _____	170
 III- Discussion. _____	 172
 <b>CHAPITRE IV: LES COMPOSES THIOLS AROMATIQUES, UNE NOUVELLE CLASSE D'INHIBITEURS DE LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE. _____</b>	  <b>175</b>
 I- Introduction _____	 177
 II- Résultats _____	 178
II-1 Réduction de la protéine R2 d' <i>E. coli</i> par le 2-thiophenethiol , le 2-méthyl-3-furanethiol et le furfuryl mercaptan-----	178
II-2. Réduction des protéines R2 de souris et R2 d' <i>A. thaliana</i> par le 2-thiophenethiol. _____	179
II-3 Réduction des protéines R2 de souris et R2 d' <i>A. thaliana</i> par le furfuryl mercaptan. _____	181
 III- Conclusion _____	 182
 <b>CONCLUSION GENERALE _____</b>	 <b>183</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>187</b>
<b>PUBLICATIONS _____</b>	<b>207</b>



## SOMMAIRE

---

I-2-Résultats. _____	134
I-2-1-Purification de la protéine MtbR2. _____	134
I-2-2-Caractérisation. _____	136
a)Teneurs en fer et en radical tyrosinyle de MtbR2. _____	137
b) Spectre UV-visible de MtbR2. _____	137
c) Caractérisation par RPE du radical tyrosinyle de MtbR2. _____	138
 I-3- Conclusion _____	 142
 II-Purification et caractérisation de la protéine R2 de <i>P.</i> <i>falciparum</i> (PfR2). _____	 143
II-1-Introduction. _____	143
II-2-Purification de PfR2. _____	145
II-3-Caractérisation de PfR2. _____	147
II-3-1-Reconstitution de PfR2. _____	147
II-3-2-Séquence de la partie N-terminale de PfR2. _____	148
II-4-Conclusion. _____	148
 <b>CHAPITRE II :ETUDE COMPARATIVE DE LA REACTIVITE DES PROTEINES R2 D'E.COLI, DE M.TUBERCULOSIS, D'A.THALIANA ET DE SOURIS. _____</b>	 <b>151</b>
 I- Introduction. _____	 153
 II- Résultats _____	 156
 III-Conclusion. _____	 158
 <b>CHAPITRE III : LE RESVERATROL, NOUVEL INHIBITEUR DE LA RNR DE MAMMIFERES ET DE PLANTES. _____</b>	 <b>159</b>
 I- INTRODUCTION _____	 161

## SOMMAIRE

---

II-2-Résultats .....	108
III- Réduction par l'hydroxyurée. ....	110
III-1-Introduction. ....	110
III-2-Résultats. ....	111
IV-Réduction par des agents réducteurs anioniques. ....	112
IV-1-Introduction. ....	112
IV-2-Résultats. ....	113
V-Cinétique de réduction du radical tyronisyle des protéines R2 mutantes I74K, et I74R par le dithionite. ....	115
VI-Discussion générale. ....	118
VII-Conclusion .....	121
 <b>PARTIE B : ETUDE DE LA REACTIVITE DU RADICAL TYROSINYLE DES PROTEINES R2 d'<i>E. coli</i>, DE <i>M. tuberculosis</i>, DE <i>P. falciparum</i>, D'<i>A. thaliana</i> ET DE SOURIS : RECHERCHE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE AUX PROPRIETES ANTI-PROLIFERATIVES SELECTIVES.</b> .....	<b>123</b>
 INTRODUCTION .....	125
 RESULTATS .....	129
 <b>CHAPITRE I : PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PROTEINES MtbR2 ET Pfr2.</b> .....	<b>131</b>
 I-Purification et caractérisation de la protéine MtbR2. ....	133
I-1-Introduction. ....	133

## SOMMAIRE

---

RESULTATS	85
-----------	----

### CHAPITRE I :CONSTRUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PROTEINES R2 MUTANTES. \_\_\_\_\_ 87

I- Construction des protéines mutantes	89
--	----

II- Surexpression et purification des protéines.	93
--	----

III- Caractérisation des protéines mutantes.	94
--	----

III-1- Effets des mutations sur les centres redox de R2.	95
--	----

1-Teneurs en fer et en radical des protéines des proteines R2 mutantes	95
---	----

2- Caractéristiques spectroscopiques.	96
---------------------------------------	----

a) Spectre UV-visible des mutants.	96
------------------------------------	----

b) Spectre RPE.	97
-----------------	----

III-2- Activité enzymatique des protéines mutantes	99
--	----

III-3- Influence des mutations sur la structure protéique.	99
--	----

1-Structure tridimensionnelle des mutants.	99
--	----

2- Structure secondaire des mutants.	100
--------------------------------------	-----

III-4-Conclusion.	101
-------------------	-----

### CHAPITRE II :ETUDE COMPARATIVE DE LA REACTIVITE DU RADICAL TYROSINYLE DES PROTEINES R2 MUTANTES AVEC LA PROTEINE R2 SAUVAGE. \_\_\_\_\_ 103

I- Cinétique de réduction par une série de phénols.	105
---	-----

I-1-Introduction.	105
-------------------	-----

I-2-Résultats.	106
----------------	-----

II-Réduction par la phénylhydrazine, l'hydrazine et l'hydroxylamine.	108
---	-----

II-1-Introduction	108
-------------------	-----

## SOMMAIRE

III-3-Préparation de la protéine R2 de <i>M. tuberculosis</i> . _____	60
III-4-Préparation de la protéine R2 de <i>P. falciparum</i> . _____	61
III-5- Préparation de la protéine M2 de souris. _____	62
III-6- Dosage des protéines. _____	63
III-7- Electrophonèse sur gel de polyacrylamide. _____	63
III-8- Reconstitution des protéines R2. _____	64
III-9- Quantification du radical tyrosinyle dans les protéines. ___	65
III-10- dosage du fer de la protéine R2. _____	65
III-11- Test d'activité enzymatique. _____	66
III-12- Méthode de réduction du radical tyrosinyle. _____	67
III-13- Culture des cellules végétales et mesure de la croissance cellulaire d' <i>A. thaliana</i> . _____	68
<b>IV- Techniques biophysiques. _____</b>	<b>69</b>
IV-1- Spectroscopie d'absorption UV-visible. _____	69
IV-2- Résonance paramagnétique électronique (RPE). _____	70
IV-3- Dichroïsme circulaire. _____	71
<b>PARTIE A :ETUDE PAR MUTAGENESE DIRIGEE DE L'EXISTENCE D'UN CANAL D'ACCES AURADICAL TYROSINYLE DE LA RDPR D'<i>E. coli</i>. _____</b>	<b>73</b>
<b>INTRODUCTION _____</b>	<b>75</b>
I-Réactivité du radical tyrosinyle : transfert d'électrons direct ou à longue distance ? _____	77
II-Choix des mutations. _____	81

## SOMMAIRE

---

<b>V- BUT DE CETTE ETUDE.</b>	<b>38</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>39</b>
<b>I-Matieriel biologique.</b>	<b>41</b>
I-1- Plasmides.	41
I-2- Les souches bactériennes.	42
I-3- Les lignées cellulaires.	43
I-4- Milieux de culture.	44
<b>II- Méthodes de biologie moléculaire.</b>	<b>44</b>
II-1- Préparation des cellules compétentes.	44
II-2- Transformation de bactéries.	45
II-3- Transfection.	45
II-4- Purification d'ADN plasmidique.	45
II-5- Purification d'ADN simple brin du phage M13.	46
II-6- Purification d'ADN double brin du phage M 13.	47
II-7- Digestion d'ADN.	47
II-8- Sous-clonage.	48
II-9- Mutagenèse dirigée.	49
II-9-1- Oligonucléotides utilisés.	49
II-9-2- Méthode de Kunkel.	50
II-9-3- Mutagenèse dirigée par PCR.	51
II-10-Séquençage d'ADN.	55
II-10-1-Méthode de Sanger.	55
II-10-2-Réaction de séquence	56
II-10-3-Tampons, gel de séquence et migration	56
<b>III- Méthodes biochimiques.</b>	<b>57</b>
III-1-Préparation de la protéine R2 sauvage et des protéines R2 mutantes d' <i>E. coli</i> .	57
III-2-préparation de la protéine R1 d' <i>E. coli</i> .	59

# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>I. L'ADN ET LES RNR's : HISTORIQUE ET IMPORTANCE.</b>	<b>3</b>
<b>II. LES DIFFERENTES CLASSES DE RNRs.</b>	<b>5</b>
II-1- LA CLASSE I.	6
II-2- LA CLASSE II.	7
II-3- LA CLASSE III.	8
II-4- UNE 4 <sup>ème</sup> CLASSE DE RNR ?	10
<b>III- LA RDPR DE CLASSE I.</b>	<b>11</b>
III-1- Réaction catalysée.	11
III-2- Structure de l'enzyme.	13
III-2-1 Structure générale.	13
III-2-2 Structure de R1.	13
III-2-3- Structure de R2.	16
1- Les centres redox de R2.	17
a) Le radical tyrosinyle.	17
b) Le centre diferrique.	20
2) Les différentes formes de la protéine R2.	22
III-3- Système d'activation de la RNR classe I de <i>E. coli</i> .	23
III-4- Mécanisme de formation du radical tyrosinyle.	25
III-5- De R2 à R1: transfert d'électrons.	27
III-6- Mécanisme de réduction des ribonucléotides.	28
<b>IV- INHIBITION DE LA RNR DE CLASSE I.</b>	<b>30</b>
IV-1 Cible protéine R1: Utilisation d'analogues de substrats.	30
IV-2 Cible: la protéine R2.	33
a) Les piègeurs de radicaux.	33
b) Les chélateurs de fer.	34
c) Les thionitrites en tant que donneurs de NO.	36
IV-3 Inhibition de l'interaction R1:R2.	36

# SOMMAIRE

## Abréviations

---

ADN	: acide désoxyribonucléique
AS	: activité spécifique
c.p.m	: coup par minute
DTT	: dithiotréitol
DO	: densité optique
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
Fe(II), Fe(III)	: Ions ferreux $Fe^{2+}$ , ferrique $Fe^{3+}$
KDa	: kilodalton
min	: minute
mV	: millivolts
nm	: nanomètre
PAGE	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PMSF	: phényl méthyl sulfonyl fluorure
RNR	: ribonucléotide réductase
RPE	: résonance paramagnétique électronique
$S_2O_4Na_2$	: dithionite de sodium
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
Tris	: tris-hydrométhyl-aminométhane
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthylène diamine
UV	: ultra-violet



## Abréviations

---

# ABBREVIATIONS

---

La réaction catalysée par les ribonucléotide réductases, la production d'éléments de base, pour le stockage de l'information génétique, est à n'en pas douter une réaction vitale pour la vie sur terre. Compte tenu de la position clé de la RNR dans la régulation de la synthèse d'ADN et du rôle de cette activité dans la division cellulaire, la RNR constitue une cible de choix pour les molécules anti-prolifératives, dans le cadre de la mise au point d'une thérapie anticancéreuse, antibactérienne et antivirale.

Cette approche thérapeutique présente de plus en plus d'intérêt, vu les nouveaux défis auxquels doit faire face la science devant certaines maladies endémiques telles que le SIDA, la recrudescence de la tuberculose (due en grande partie au SIDA), la malaria,... etc.

## II. LES DIFFERENTES CLASSES DE RNRs.

Les RNRs qui sont toutes des protéines radicalaires diffèrent sur de nombreux points :

- (i) Leurs structures primaires et quaternaires.
- (ii) La nature des cofacteurs impliqués dans le processus de réduction.
- (iii) Le type de substrats utilisés NDPs ou NTPs.

Quelles que soient leurs différences, ces enzymes sont élaborées sur le même thème, la chimie radicalaire. Par contre, l'entité radicalaire formée est diverse (radical tyrosinyle, radical glycinyle, cofacteur cobalamine).

Jusqu'à présent, au moins 3 classes de RNRs ont été identifiées. Ces différentes classes sont décrites dans le tableau 1.

## INTRODUCTION GENERALE

classes	organismes	structure	cofacteur	substrat	gène
Ia	virus bactéries <i>E. coli</i> <i>P. falciparum</i> eucaryotes souris <i>A. thaliana</i>	$\alpha 2\beta 2$	$Fe^{3+}-O-Fe^{3+}$ radical tyrosinyle	NDP	<i>nrdAB</i>
Ib	bactéries <i>E. coli</i> <i>M. tuberculosis</i>	$\alpha 2\beta 2$	$Fe^{3+}-O-Fe^{3+}$ radical tyrosinyle	NDP	<i>nrdEF</i>
II	bactéries <i>L. leichmannii</i> Archae	$\alpha$ ou $\alpha 2?$	B12	NTP NDP	<i>nrdC</i>
III	bactéries <i>E. coli</i> Bactériophage T4	$\alpha 2\beta 2$	S-Adénosyl- méthionine Centre 2Fe-2S radical glycinyle	NTP	<i>nrdDG</i>

**Tableau 1** : Les différentes classes de RNR et leurs caractéristiques.

### II-1- LA CLASSE I.

C'est la classe la plus nombreuse avec pas moins de 25 gènes entièrement séquencés. Elle est subdivisée en deux sous-classes : la sous-classe Ia et la sous-classe Ib. On la retrouve chez les mammifères, les plantes, quelques bactéries (*E. coli*), bactériophages et virus tel que le virus de l'Herpès HSV1 et HSV2.

La description de la RNR de classe Ia est basée sur l'étude de la RDPR d'*E. coli* qui est l'enzyme la mieux caractérisée et le prototype de cette classe. Elle est composée de deux sous unités homodimériques appelées R1 et R2 codées respectivement par les gènes *nrdA* et *nrdB*. La sous unité R1 possède les

sites de fixation des substrats et des effecteurs allostériques. R2 contient par monomère deux cofacteurs très importants de l'enzyme :

- Un centre diferrique
- Un radical tyrosinyle stable essentiel à la catalyse enzymatique.

La sous-classe Ib codée par les gènes *nrdEF* est également constituée de deux composés homodimériques R1E et R2F (Jordan et al., 1994). La sous-classe Ib est trouvée dans les bactéries telles que *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhimurium* (Jordan et al., 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Yang et al., 1994). On la retrouve aussi dans *E.coli* mais les conditions normales de culture au laboratoire ne permettent pas une expression efficace de l'enzyme (Jordan et al., 1996). Les caractéristiques de la sous-classe Ib sont les mêmes que celles de la sous-classe Ia, à part la perte du côté N-terminal de la protéine R1 de 50 acides aminés.

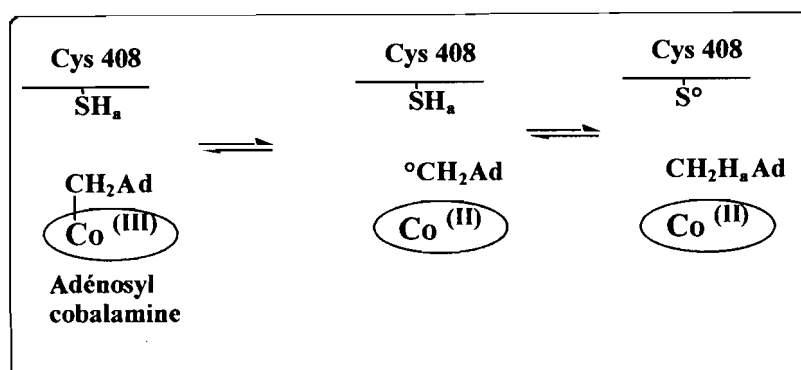
Le travail de cette thèse est basé sur l'étude des RNRs de classe I, qui seront donc présentées plus en détail dans la partie suivante.

### II-2- LA CLASSE II.

La RNR de classe II, dont le représentant est l'enzyme de *Lactobacillus leichmannii*, est codée par le gène *nrdC* (Panagou et al., 1972), et utilise la 5'-désoxyadénosyl-cobalamine (ou coenzyme B12) comme cofacteur (Gleason et al., 1972). Cette classe, présente chez les microorganismes aérobies et anaérobies, utilise les nucléosides triphosphates comme substrats.

Il est proposé qu'une fois activé par fixation sur la protéine, le coenzyme B12 conduit à la formation de Co(II) et d'un radical 5'-désoxyadénosyle, responsable de l'oxydation d'un résidu cystéine de la protéine en radical thiyle (figure 3). Ce dernier serait directement impliqué dans la réduction du ribonucléotide (Stubbe et al., 1990). La présence de ce radical thiyle a récemment été démontrée expérimentalement chez *Lactobacillus leichmannii* (Licht et al.,

1996) et se situe sur la cystéine 408. Deux autres cystéines, essentielles à la catalyse (Cys 119 et Cys 419), doivent jouer le rôle de groupes redox actifs lors de la réduction du substrat (Booker et al., 1994).



**Figure 3 :** Clivage de la molécule B12, dans la RNR de classe II.

Récemment trois RNRs d'archaebactéries ont été séquencées. Il s'agit d'organismes anaérobies stricts, méthanogène *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996), et thermophiles *Pyrococcus furiosus* (Riera et al., 1996) et *Thermoplasma acidophila* (Tauer et al., 1996). Les deux dernières sont décrites comme des ribonucléotide diphosphate réductases B12 dépendantes, et présentent des similitudes de séquences aussi bien avec l'enzyme de classe I que celle de classe II. Au niveau de leur séquence, on retrouve trois cystéines redox actives catalytiquement essentielles, connues pour être localisées dans le site actif de la RNR de classe I.

### II-3- LA CLASSE III.

La RNR de classe III est une enzyme sensible à l'oxygène, trouvée chez certaines espèces anaérobies facultatives ou anaérobies strictes (Fontecave et al., 1989 ; Young et al., 1994 ; Reichard et al., 1997). Les données génétiques et biochimiques permettant de décrire la RNR de classe III proviennent de l'étude de la ribonucléotide-triphosphate réductase d'*E. coli* (Ollagnier et al., 1996 et 1997) et de l'enzyme du bactériophage T4 (Young et al., 1994).

## INTRODUCTION GENERALE

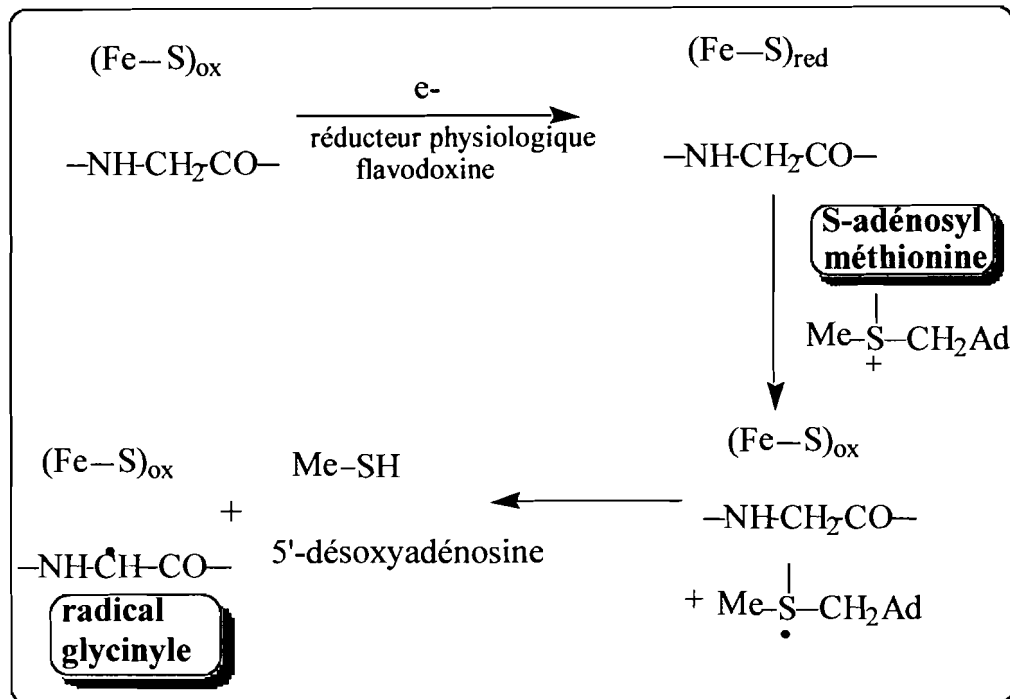
---

L'enzyme est composée de deux sous-unités homodimériques  $\alpha_2$  et  $\beta_2$  codées respectivement par les gènes *nrdD* et *nrdG*. La grosse sous-unité d'*E. coli*,  $\alpha_2$ , est composée de 712 acides aminés et possède les sites de fixation des substrats, NTPs, ainsi que des effecteurs allostériques. Elle contient également un radical glycinyle stable situé en position 680 pour l'enzyme d'*E. coli* et en position 581 pour l'enzyme du bactériophage T4. Ce radical glycinyle est nécessaire à l'activité de l'enzyme, et est considéré comme l'initiateur de la catalyse de réduction des ribonucléotides. Le radical glycinyle est formé grâce à la rupture homolytique de la S-Adénosyl méthionine (figure 4), après réduction par un électron délivré par le système flavodoxine-flavodoxine oxydoréductase, et le NADPH.

On note sur la chaîne sept résidus cystéines conservés. Les études de mutagenèse dirigée effectuées sur ces cystéines indiquent que ces résidus interviennent dans le mécanisme de réaction de l'enzyme de classe III, en tant que composés redox actifs.

La petite sous-unité  $\beta_2$  contient un cluster  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  par chaîne polypeptidique, qui après réduction par un réducteur chimique comme le dithionite ou par le système biologique flavodoxine-flavodoxine oxydoréductase, donne un centre  $[4\text{Fe-4S}]^+$ , proposé comme l'espèce responsable de l'activation réductrice (figure 4) (Ollagnier et al., 1996).

La réactivation réductrice de la RNR de classe III est réalisée par le formiate, lequel est oxydé en dioxyde de carbone (Mulliez et al., 1995).



**Figure 4** : Mécanisme de formation du radical glycinyle dans la RNR de classe III.

#### II-4- UNE 4<sup>ème</sup> CLASSE DE RNR ?

Il a été suggéré l'existence d'une nouvelle classe de RNRs utilisant du manganèse comme cofacteur dans des bactéries telles que *Brevibacterium ammoniagenes*, et *Corynebacterium ammoniagenes* (Willing et al., 1988 ; Fieschi et al., 1998). Cette RNR serait en fait très proche de la RNR de classe I avec du manganèse à la place du fer au niveau du site métallique. La RNR de *B. ammoniagenes*, caractérisée par Willing et al., 1988 a une structure  $\alpha_2\beta$  et un centre binucléaire à  $Mn^{3+}$ , analogue au cluster diferrique de la RNR aérobie d'*E. coli*. Aussi, il semble que cette enzyme, comme toutes les autres RNRs décrites

jusqu'à présent, utilise une chimie radicalaire, même si ce point n'est pas encore établi.

Des études génétiques et biochimiques sont néanmoins en cours actuellement pour permettre une meilleure caractérisation de cette RNR.

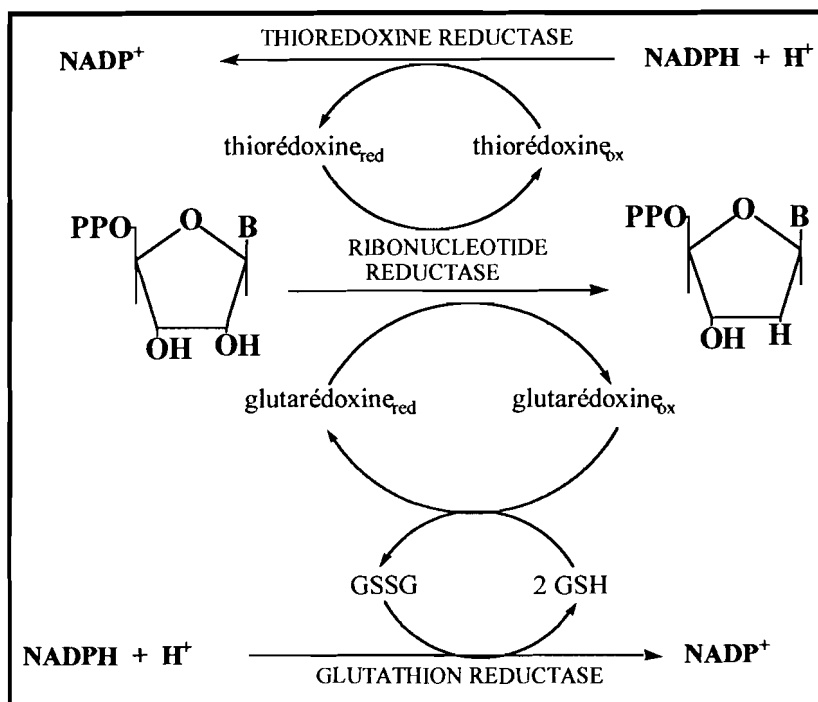
Certains organismes peuvent utiliser plusieurs types de RNRs pour proliférer. Par exemple, *E. coli* a une RNR de classe Ia pour sa croissance en aérobiose, mais utilise une RNR de classe III en conditions d'anaérobiose. D'autres combinaisons ont été observées telles que la RNR de classe Ib et celle de classe III dans *Lactococcus lactis* (Jordan et al., 1996) ou la RNR de classe Ia et celle de classe Ib dans *S. typhimurium* (Jordan et al., 1994). Mais on ne connaît pas d'exemple d'organisme possédant la RNR de classe II avec un autre type de RNR.

### III- LA RDPR DE CLASSE I.

#### III-1- Réaction catalysée.

La ribonucléotide réductase de classe I catalyse la conversion des ribonucléoside diphosphates en leurs désoxyribonucléotides correspondants, fournissant les précurseurs monomériques requis pour la biosynthèse de l'ADN. Cette réaction consiste en la substitution par un hydrogène du groupement hydroxyle, situé en position 2' du ribonucléotide avec, comme donneurs d'hydrogène, les groupements dithiols présents dans le site actif de l'enzyme. Elle nécessite un apport constant d'équivalents réducteurs, l'ultime donneur d'électrons étant le NADPH (figure 5).





**Figure 5** : Réaction catalysée par la RDPR d'*E. coli* : les composés intervenant dans la chaîne de transfert d'électrons.  
 Abréviations: GSH, glutathion-SH ; GSSG, (glutathion-S)<sub>2</sub> ; red, réduite ; ox, oxydée.

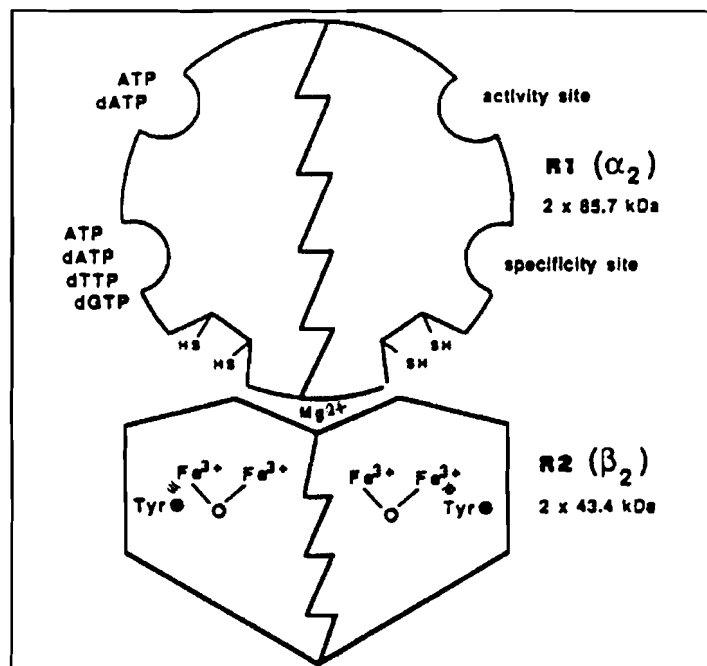
Deux systèmes biologiques participent à la chaîne de transfert d'électrons (Holmgren 1989) : le système thiorédoxine-thiorédoxine réductase d'une part, et le système glutarédoxine-glutathion-glutathion réductase d'autre part.

La RNR de classe Ib ne peut utiliser la thiorédoxine comme transporteur d'électrons. Un transporteur spécifique d'électrons, une nouvelle rédoxine, a été découvert sur son opéron (Jordan et al., 1996).

### III-2- Structure de l'enzyme.

#### III-2-1 Structure générale.

La ribonucléotide réductase est composée de deux sous unités homodimériques R1 et R2. Les deux protéines sont purifiées séparément et s'associent en présence de  $Mg^{2+}$  pour former un complexe 1:1. La figure 6 montre un modèle général de la structure de la RDPR d'*E. coli*.



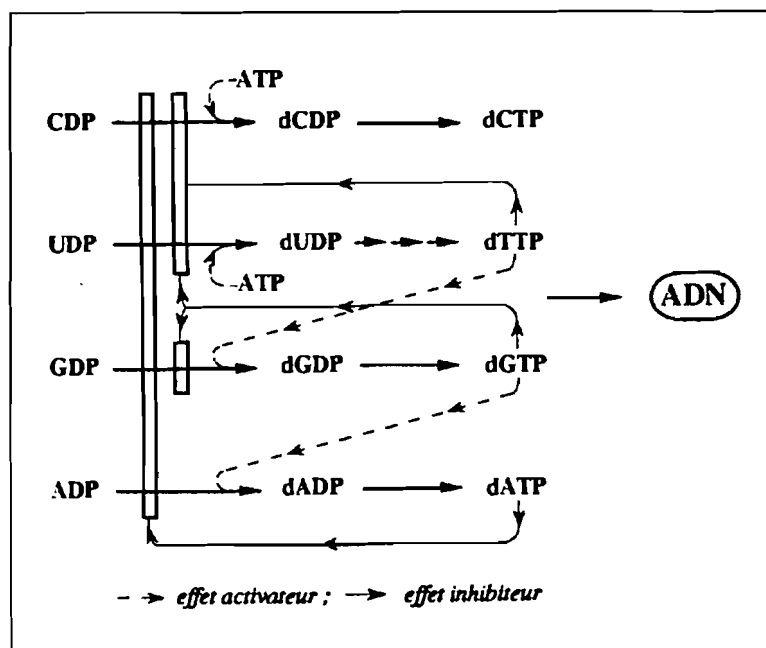
**Figure 6** : Structure générale de la RDPR d'*E. coli*.

#### III-2-2 Structure de R1.

Deux chaînes polypeptidiques de 761 acides aminés ( $2 \times 85,7$  kDa) (figure 6) constituent la protéine homodimérique R1. Elle possède les sites de fixation des quatre substrats NDPs, mais également les sites de régulation allostérique qui se divisent en deux classes : deux sites pour contrôler l'activité globale de l'enzyme (fixant soit l'ATP, soit le dATP) et deux autres pour diriger la

spécificité du substrat pouvant fixer l'ATP, le dATP, le dTTP et le dGDP (Döbeln von et al., 1976).

L'effet activateur ou inhibiteur de ces nucléotides sur l'enzyme est illustré dans la figure 7.



**Figure 7** : Régulation physiologique de la synthèse des désoxyribonucléotides

Cette régulation complexe de l'enzyme permet de maintenir des quantités contrôlées de dNTPs dans la cellule.

Il faut noter que, dans la RNR de classe Ib, le dATP stimule la réduction du CDP, alors qu'il inhibe toute activité réductase dans la classe Ia.

R1 contient également des cystéines redox actives nécessaires à la catalyse enzymatique (Thelander et al., 1974). Certaines, localisées dans le site actif, interviennent directement dans la réduction des ribonucléotides ; les autres servent de médiateurs d'électrons, en interagissant avec la thiorédoxine ou la glutarédoxine (Äberg et al., 1989 ; Mao et al., 1989). Cinq cystéines conservées (Cys 225, 439, 462, 754 et 759) parmi les 11 cystéines de la protéine R1 d'*E. coli* constituent ces thiols redox actifs.

## INTRODUCTION GENERALE

Des expériences de mutagenèse dirigée (Äberg et al., 1989 ; Mao et al., 1989) et de marquage (Lin et al., 1987) ont permis de déterminer leur rôle :

- Les cystéines 754 et 759, localisées dans la partie C-terminale, sont des médiateurs d'électrons entre la thiorédoxine ou la glutarédoxine d'une part, et les dithiols actifs d'autre part.

- Les cystéines 225 et 462, situées dans le site actif, participent directement au processus catalytique.

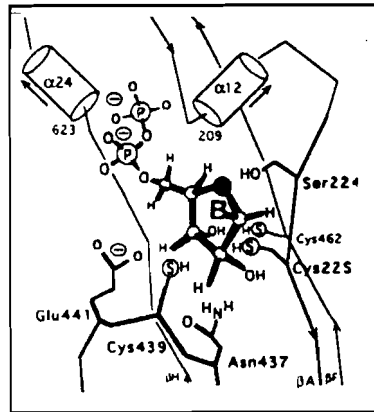
- De façon analogue à celle de la cystéine 408, dans l'enzyme de classe II de *Lactobacillus leichmannii* (Stubbe et al., 1990), la cystéine 439 serait le siège de la formation d'un radical thiyle, permettant la réduction en 2' du ribose, lors de la catalyse. Ceci serait en accord avec l'observation que les mutants Cys439Ser et Cys439Ala R1 sont totalement inactifs (Mao et al., 1992).

Récemment, la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine R1 par Uhlin et Eklund, 1994 (figure 8), a permis de mettre en évidence 3 domaines : un domaine N-terminal formé d'hélices, un domaine central constitué d'une structure particulière en forme de tonneau, composée de 10 unités  $\alpha/\beta$ , et un domaine C-terminal.



**Figure 8** : Structure tridimensionnelle de la protéine R1 d'*E. coli* d'après Uhlin et Eklund, 1994.

Un modèle de structure du complexe protéine R1-substrat a également été établi, montrant le positionnement des cystéines du site actif (Cys 439, 225 et 462) autour du ribonucléotide (Eriksson et al., 1997) (figure 9).



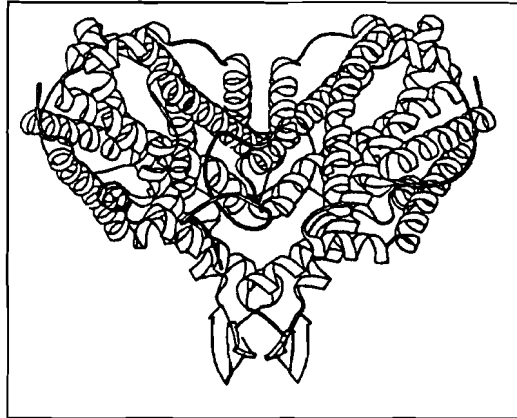
**Figure 9** : Structure du complexe protéine R1-substrat.

### III-2-3- Structure de R2.

La protéine R2 est un dimère constitué de deux chaînes polypeptidiques identiques de 375 acides aminés chacune (2 x 43,4 kDa), et contenant les cofacteurs de l'enzyme qui sont tout à fait originaux et remarquables :

- Un radical tyrosinyle stable, identifié comme produit de l'oxydation mono électronique de la Tyr122.
- Un centre binucléaire dans lequel deux ions ferriques sont liés par un pont  $\mu$ -oxo avec un fort couplage antiferromagnétique.

La structure tridimensionnelle de la protéine R2, a été résolue à 2,2 Å de résolution (Nordlund et al., 1990). Elle est constituée en grande majorité d'hélices  $\alpha$  (figure 10). Les deux chaînes polypeptidiques sont étroitement liées, donnant à la protéine une forme de cœur.



**Figure 10** : Structure tridimensionnelle de la protéine R2.

### 1- Les centres redox de R2.

#### a) Le radical tyrosinyle.

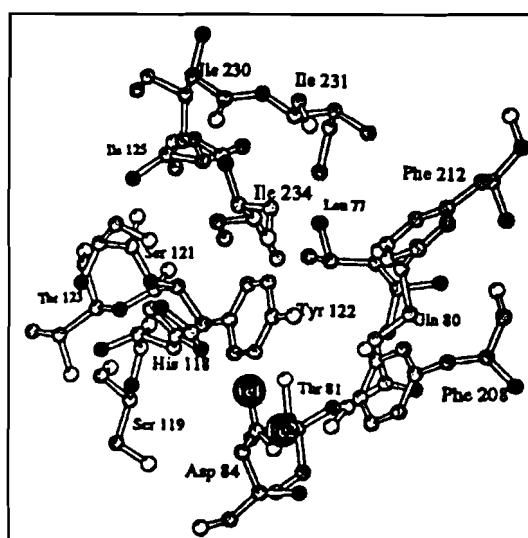
Une des caractéristiques principales des RNRs de classe I est la présence sur la protéine R2 d'un radical tyrosinyle stable, indispensable à l'activité de l'enzyme. Ce radical a été mis en évidence pour la première fois en 1972, grâce à son spectre RPE (figure 12), montrant un doublet caractéristique centré à  $g = 2,0047$  (Ehrenberg et al., 1972 ; Sjöberg et al., 1978 ; Gräslund et al., 1985). Ce fut le premier radical organique découvert dans une protéine et caractérisé en détail. Depuis, d'autres ont été mis en évidence par des méthodes spectroscopiques, et on peut maintenant parler d'une famille d'enzymes radicalaires.

Le tableau 2 regroupe ces protéines radicalaires, le type de radical, et l'année de leur mise en évidence sont notés (adaptés de Siegel 1994).

protéines radicalaires	centre redox	Année
La RNR aérobie	Tyrosine, fer	1972
Photosystème II	Tyrosine(s), Mn	1987
Prostaglandine synthétase	Tyrosine(s), fer	1988
Cytochrome c peroxydase	tryptophane, fer	1989
Amine oxydase	TOPA, cuivre	1990
Méthylamine déshydrogénase	TQQ, amicyamine(Cu)	1991
Galactose oxydase	Tyrosine modifiée, Cu	1991
Pyruvate formate lyase	Glycine, activase(fer)	1992
La RNR anaérobie	Glycine, fer-soufre	1992

**Tableau 2** : Les différentes protéines radicalaires, l'année de leur mise en évidence et la nature de leur centre redox.

Le radical tyrosinyle d'*E. coli*, enfoui dans la protéine R2 à au moins 10 Å de la surface (Nordlund et al., 1990), est localisé dans une poche hydrophobe composée des acides aminés conservés Phe 208, Phe 212, Ile 234 et non conservés Ile 125, 230, et 231, Leu 77, et Phe 216. (figure 11) (Örmo et al., 1995).



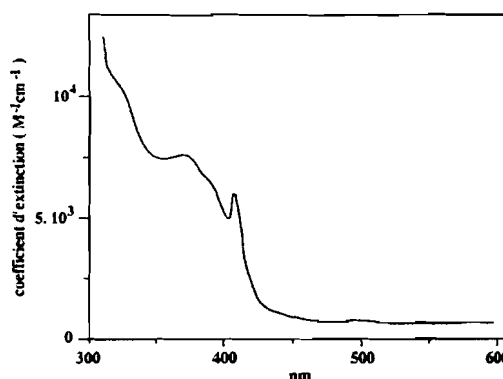
**Figure 11** : Résidus constituant l'environnement du radical tyrosinyle de la protéine R2.

## INTRODUCTION GENERALE

En spectroscopie UV-visible (Atkin et al., 1973) (figure 13), on lui attribue le pic d'absorption fin à 410 nm ( $\epsilon_{410} = 6\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ainsi que l'épaule à 390 nm ( $\epsilon_{390} = 7\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ce pic à 410 nm montre que le radical est sous forme déprotonée, ce qui est confirmé par le spectre Raman de R2 qui présente une bande de résonance d'intensité importante à  $1498\text{ cm}^{-1}$ , due à la vibration de la liaison C-O<sup>o</sup> (Backes et al., 1989).



**Figure 12** : Spectre RPE du radical tyrosinyle protéine R2.



**Figure 13** : Spectre UV-visible de la de la protéine R2.

Des expériences ENDOR (Bender et al., 1989) ont permis de préciser la nature du radical : ce dernier n'est pas chargé et ne forme pas de liaisons hydrogènes avec son environnement. La distance de  $5.3\text{ \AA}$  entre la Tyr 122, et l'atome de fer le plus proche exclut une interaction directe entre les deux. Les essais de mesure du potentiel redox du radical tyrosinyle sont gênés par son inaccessibilité à la plupart des réducteurs. La meilleure estimation faite (Silva et al., 1995) est de  $1000 \pm 100\text{ mV}$ .

A l'inverse des autres enzymes radicalaires, la protéine R2 se caractérise par la grande stabilité de son radical tyrosinyle, qui est due à plusieurs facteurs :

- L'absence d'acides aminés facilement oxydables à proximité de la tyrosine, avec la présence de la poche hydrophobe.



- L'établissement d'interactions magnétiques avec le centre diferrique, situé à proximité.

### **b) Le centre diferrique.**

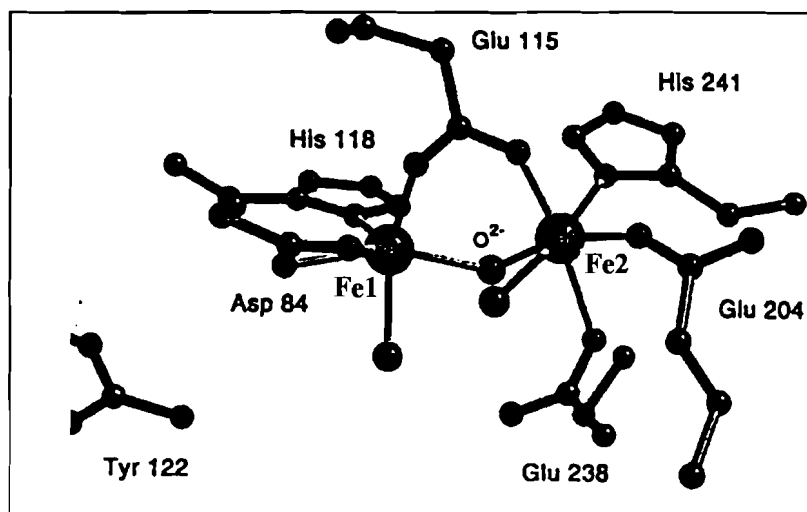
Le centre binucléaire de fer de l'enzyme de classe I est le site métallique le mieux caractérisé des RNRs. La fonction de ce site dans la protéine R2, durant la catalyse ou après la formation du radical, reste de nos jours une énigme. Par contre son rôle dans la formation du radical tyrosinyle est bien établi, et le mécanisme de la réaction sera exposé en détail dans un des paragraphes suivants.

Le site diferrique des ribonucléotide réductases de classe I a en commun des propriétés structurales et spectroscopiques avec plusieurs protéines à fer. Ces protéines constituent la famille des protéines à centre binucléaire de fer, dans lequel les deux atomes de fer sont pontés par un seul pont  $\mu$ -oxo ou  $\mu$ -hydroxo, et dont l'hémérythrine (Klotz et al., 1976), petite protéine transportant l'oxygène dans certains invertébrés marins, fut la première découverte. D'autres exemples de cette famille sont :

- Le composé hydroxylase de la méthane monooxygénase (MMO) (Rosenzweig et al., 1993).
- La rubrérythrine (deMaré et al., 1996).
- La phosphatase acide pourpre (Klabunde et al., 1995).
- La ferritine (Harrison et Arosio 1996).
- La toluène-4-monooxygénase (Pikus et al., 1996).

La structure tridimensionnelle du site diferrique dans la protéine R2 d'*E. coli* (Nordlund et al., 1990, 1993) présente deux ions ferriques par monomère, distants de 3,4 Å, couplés de façon antiferromagnétique par un pont  $\mu$ -oxo et un seul pont carboxylate, le résidu Glu 115. Les sites de coordination du fer sont en majorité des ligands carboxylates, à la différence de l'hémérythrine où on a une

prédominance de ligands histidinyles (Stenkamp et al., 1984,1985; Shériff et al., 1987).



**Figure 15:** Structure tridimensionnelle du site diferrique de la protéine R2 d'*E. coli*.

La dénomination Fe1 et Fe2 des deux atomes de fer est basée sur leur proximité par rapport au résidu radicalaire tyrosine 122 (figure 15). La sphère de coordination du Fe1 inclut, en plus du résidu Glu 115 et du pont  $\mu$ -oxo, un carboxylate bidentate (Asp 84), un imidazole (His 118), et une molécule d'eau. Les ligands du Fe2 sont composés (en plus des deux ponts) de deux carboxylates monodentates (Glu 204 et Glu 238), d'un imidazole (His 241) et d'une molécule d'eau.

La seconde sphère de coordination englobe le radical tyrosinyle situé à 5,3 Å du Fe1, un carboxylate (Asp 237), et une sérine (Ser 114), formant des liaisons hydrogènes avec l'His 118, His 241 et la Gln 43.

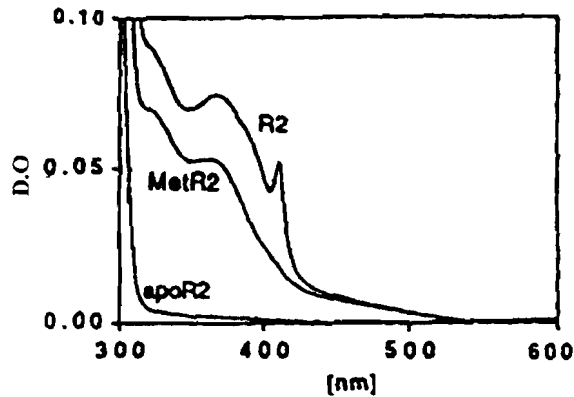
D'autres ions métalliques ( $\text{Co}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ) peuvent occuper le site dinucléaire de la protéine R2. Mais aucun d'eux n'a la capacité de former le radical tyrosinyle, ce qui indique que la fixation de l'oxygène moléculaire ou l'oxydation d'un tel site métallique est

gênée. La protéine R2 à manganèse a été étudiée par RPE et par cristallographie (Atta et al., 1992) aux rayons X. Les études ont montré que les ions manganèses occupaient les mêmes sites que les ions ferriques, mais que la structure du site métallique devenait plus symétrique avec l'existence de deux ponts carboxylates (Glu 115, et Glu 238).

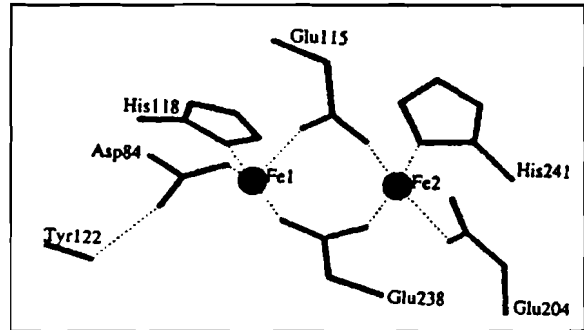
### 2) Les différentes formes de la protéine R2.

Outre la forme active de la protéine R2 contenant le site diférique et le radical tyrosinyle, d'autres états de la protéine R2 ont été mis en évidence. R2 actif peut être la cible de piègeurs de radicaux tels que les polyphénols ou l'hydroxyurée, et donner une forme sans radical, mais avec le centre diférique intact, dénommée **metR2**.

Par traitement de la protéine R2 avec un chélateur puissant la 8-hydroxyquinoline, on obtient un état protéique sans radical, et sans centre métallique, appelé **apoR2** (Atkin et al., 1973). Après addition en anaérobiose d'ions ferreux à l'apoR2, on obtient une autre forme toujours sans radical, mais avec un centre métallique ferreux, dénommée **R2réduit**. R2réduit peut également être obtenue par réduction chimique (Sahlin et al., 1989; Gerez et Fontecave 1992) ou enzymatique (Covès et al., 1993) de la protéine metR2. On a alors un processus de réduction à deux électrons du centre binucléaire de fer (Silva et al., 1995). Le potentiel redox du couple  $Fe^{III}/Fe^{II}$  dans R2 d'*E. coli* est de -115mV (Silva et al., 1995). La structure tridimensionnelle de R2réduit, récemment résolue (Logan et al., 1996) montre que les deux ions ferreux distants de 3,9 Å, sont pontés par la Glu-115 et la Glu-238. Par rapport à la structure de la forme ferrique, il y a donc eu un déplacement du carboxylate de la Glu 238 et disparition du pont  $\mu$ -oxo, rendant la structure plus symétrique (figure 17). Les spectres UV-visible de ces trois formes de la protéine R2 sont reportés figure 16.



**Figure 16:** Spectres UV-visible des différents états de la protéine R2 d'*E. coli*.



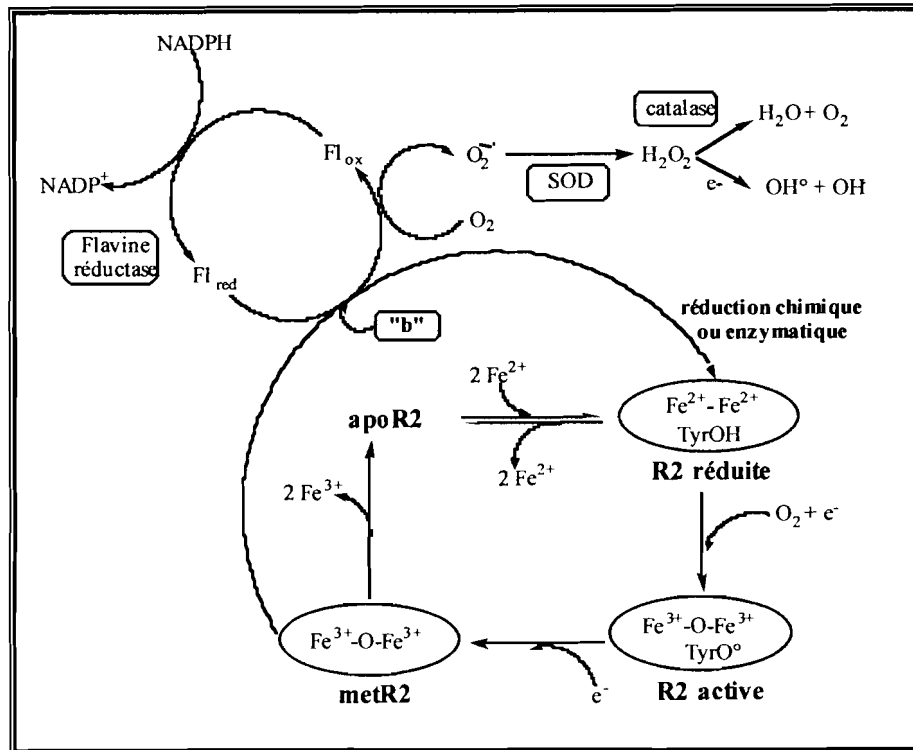
**Figure 17 :** Structure du site diferreux de la RNR-R2red.

Une forme valence mixte  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{II}}$  instable de la protéine R2 d'*E. coli* a été obtenue par réduction à un électron du centre diférique avec l'hydrazine, le diazène (Gerez et al., 1991 et 1992) ou par irradiation  $\gamma$  (Hendrich et al., 1991; Davydov et al., 1994 et 1996) et caractérisée en RPE.

### III-3- Système d'activation de la RNR classe I de *E. coli*.

La sous unité R2 existe sous différentes formes dont une seule permet l'activité enzymatique lors de l'association avec R1. L'état redox du centre métallique et de la tyrosine 122 définit les différentes formes de la protéine. La figure 18 décrit les différents états de R2 et le système d'activation conduisant à la forme active.

## INTRODUCTION GENERALE



**Figure 18** : Système d'activation de la ribonucléotide réductase d'*E. coli*.

La réactivation de la protéine metR2 fait intervenir plusieurs composés protéiques:

- Une flavine réductase de 26 kDa, qui utilise le NADPH ou le NADH pour produire des flavines libres réduites (FMN,FAD), directement impliquées dans la réduction du centre diferrique (Fontecave et al., 1989;Covès et al., 1993; Fontecave et al., 1994)
- Une fraction relativement mal définie (pouvant être remplacée par du Fe<sup>II</sup>) appelée fraction b (Covès et al., 1997)
- Une superoxyde dismutase (SOD) et une catalase qui protègent la RNR aérobie des ions superoxydes, et du peroxyde d'hydrogène, dérivés de l'oxydation spontanée des flavines réduites par l'oxygène de l'air et qui dénaturent la protéine (Barlow et al., 1986; Fontecave et al., 1987 ; Gaudu et al., 1996).

En effet, la RNR est une enzyme sensible aux conditions de stress oxydant, et a besoin de la superoxyde dismutase et de la catalase pour s'en protéger

(Eliasson et al., 1986; Fontecave et al., 1987). Le superoxyde détruit efficacement le radical tyrosinyle de la RNR (Gaudu et al., 1996). C'est un des exemples d'une réaction toxique directe du superoxyde sur une cible biologique, démontrant ainsi la nécessité pour tout organisme vivant aérobie d'en être protégé par la superoxyde dismutase.

L'obtention de la forme active de R2 se fait en deux étapes. Dans la première, la flavine réductase catalyse la réduction des flavines libres. Celles-ci vont ensuite, en présence de la fraction b, réduire chimiquement le centre diferrique  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Dans la deuxième étape, la forme R2 réduite fixe et active l'oxygène pour permettre l'oxydation monoélectronique de la tyrosine 122 (figure 18).

### III-4- Mécanisme de formation du radical tyrosinyle.

Dans les RNRs de classe I, la formation du radical tyrosinyle survient durant l'oxydation de la forme ferreuse de la protéine R2.

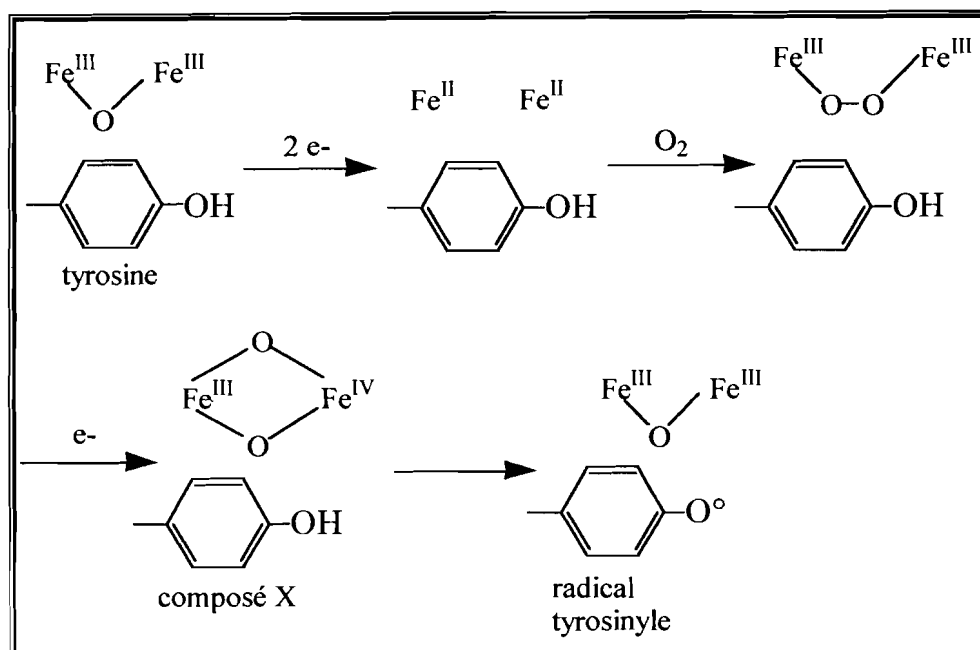
L'équation de la réaction peut se résumer ainsi :



La nette réduction de  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , est un processus à quatre électrons. Deux sont fournis par le centre métallique, un par la tyrosine 122 et le 4<sup>ème</sup>, vraisemblablement par un réducteur présent dans le solvant (exemple un excès de  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Sahlin et al., 1995).

Le centre dinucléaire de fer non hémique catalyse l'activation réductrice de l'oxygène moléculaire pour former un complexe à haut degré d'oxydation, appelé composé X, qui est responsable de l'oxydation de la tyrosine 122, en un radical

tyrosinyle stable (Tong et al., 1996; Sturgeon et al., 1996; Fontecave et al., 1987 et 1989) (figure 19).



**Figure 19** : Mécanisme de formation du radical tyrosinyle dans la RNR de classe I.

Les détails de la réaction ont été étudiés durant la reconstitution de l'apo protéine R2 sauvage et du mutant Y122F, par spectroscopies RPE, Mössbauer et ENDOR, ainsi que par cinétique rapide (Sahlin et al., 1994; Bollinger et al., 1994; Sahlin et al., 1995; Ravi et al., 1994; Burdi et al., 1996; Sturgeon et al., 1996) :

- Le **composé X** est une espèce couplée, à haut degré d'oxydation, de type  $\text{Fe}(\text{III})-\text{Fe}(\text{IV})$  de spin  $1/2$  (Sturgeon et al., 1992). De récentes études ENDOR ont permis d'identifier trois ligands oxygénés, vraisemblablement l'oxygène moléculaire et des molécules d'eau du solvant. L'espèce X est également associée en UV-visible à une bande d'absorption à 365 nm.

Les mutations dans R2 d'*E. coli* affectant les ligands du fer (D84A/H, E204A, E238A et H241A) (Persson et al., 1996), ne perturbent pas la structure du site métallique, puisqu'on a toujours les bandes d'absorption à 320 et 370 nm,

indiquant un site diferrique à pont  $\mu$ -oxo. Les mutations n'affectent pas non plus la séquence de réaction conduisant à l'activation de la protéine.

Par contre, l'étude de la mutation phénylalanine 208 (résidu de la poche hydrophobe entourant le radical tyrosinyle et proche du site métallique) en tyrosine, indique que de légers changements dans l'environnement proche du centre métallique peut perturber sa chimie. En effet, on observe la formation d'un complexe fer-catécholate (de couleur bleue, caractérisé par une bande d'absorption à 700 nm), suite à l'oxydation catalytique à deux électrons de la Tyr 208 en dopa. Dans ce mutant (F208Y), il semble que l'hydroxylation de la Tyr 208 très proche du fer est compétitive par rapport à l'oxydation mono-électronique de Y122. Ceci montre la capacité du centre ferrique à catalyser des hydroxylations et montre que l'environnement de Y122 doit être bien choisi pour que l'oxydation s'applique sélectivement à Y122 (Ormö et al., 1992; Åberg et al., 1993).

### **III-5- De R2 à R1: transfert d'électrons.**

Des études de mutagenèse dirigée et cristallographiques sur les protéines R1 et R2 de classe Ia d'*E. coli* ont permis d'identifier un certain nombre d'acides aminés essentiels à la catalyse enzymatique.

Les deux sous-unités R1 et R2 s'associent en présence de magnésium pour former l'holoenzyme, catalytiquement actif. L'interaction entre les deux protéines, est de type électrostatique et hydrophobe.

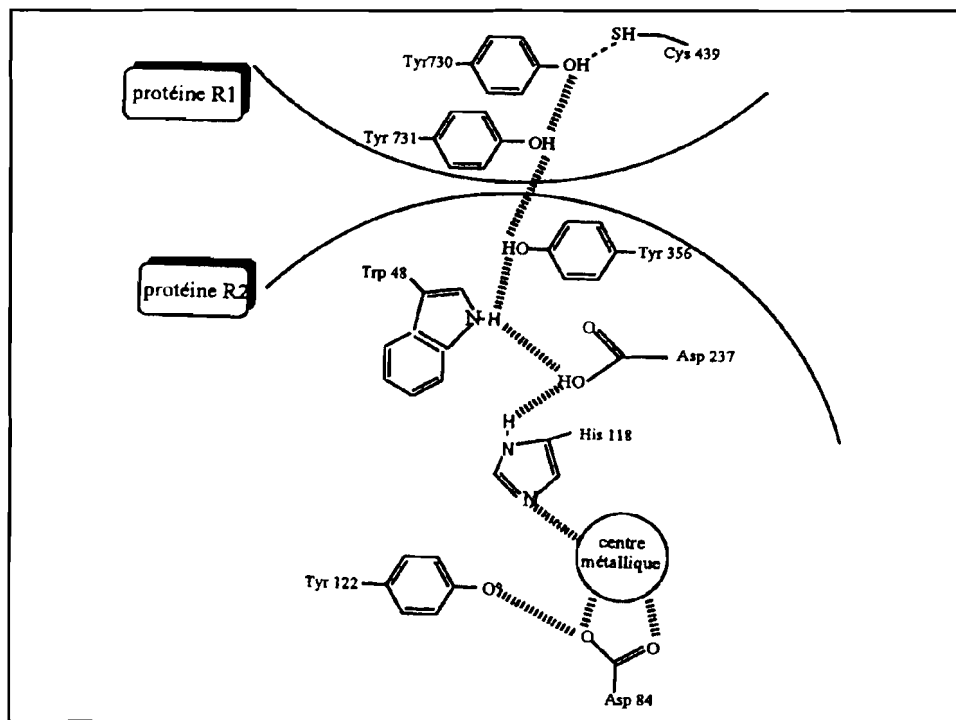
La protéine R1 fixe les substrats et les effecteurs allostériques alors que le radical tyrosinyle de la protéine R2 est connu pour initier la catalyse dans l'holoenzyme R1:R2, par abstraction d'un atome d'hydrogène en position 3' du substrat. Mais une distance d'environ 35 Å sépare la tyrosine 122 sur la protéine R2 de la cystéine 439, identifiée comme le site radicalaire directement impliqué dans la réduction du ribonucléotide, sur la protéine R1. Par conséquent, la chimie



## INTRODUCTION GENERALE

radicalaire au niveau du site du substrat n'est possible que par un transfert à longue distance du centre radicalaire de Tyr 122 située sur la protéine R2 vers la Cys 439 sur la protéine R1. Ce transfert de radical est probablement contrôlé par la fixation du substrat et des effecteurs allostériques.

A partir d'informations structurales et d'études de mutagenèse dirigée, une voie de transfert de radical a été formellement identifiée (Figure 20). Il s'agit d'une chaîne de liaisons hydrogènes formée de 6 résidus acides aminés conservés dans R2 (Y122, les ligands du fer, D84 et H118, et D237, W48, Y356) suivie par une autre chaîne de liaisons hydrogène de 3 résidus acides aminés conservés sur R1 (Y730, Y731 et C439) (Sjöberg et al., 1994 et 1995). Une seule mutation sur l'un de ces résidus entraîne l'inactivation de l'enzyme (Climent et al., 1992; Rova et al., 1995; Ekberg et al., 1996).



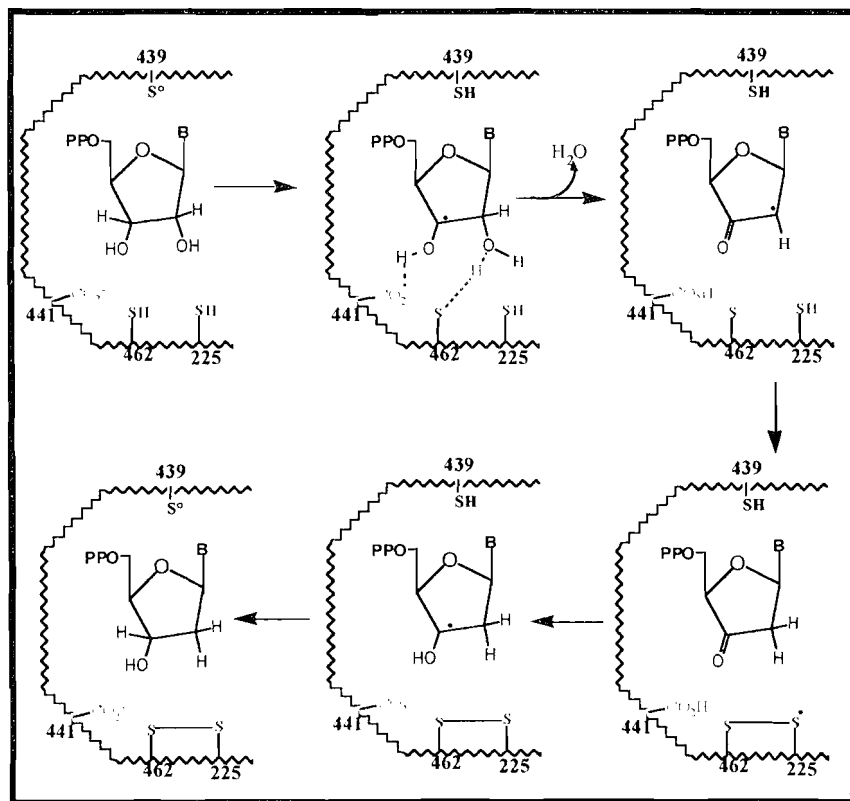
**Figure 20:** Chaîne de transfert du centre radicalaire de R2 vers R1 dans la RNR de classe I d'*E. coli*.

### III-6- Mécanisme de réduction des ribonucléotides.

Toutes les RNRs sont des enzymes radicalaires. Elles portent un radical libre, lequel est nécessaire à la catalyse enzymatique. La réaction de réduction des ribonucléotides passe donc par un mécanisme radicalaire. En se basant sur des expériences de mutagenèse dirigée, de marquage...etc., Stubbe (1995), a pu proposer un mécanisme de réaction illustré par la figure 21.

Trois résidus cystéines et un glutamate sont directement impliqués dans la réduction des ribonucléotides:

- La cystéine 439, identifiée comme le radical thiyle  $X^\circ$  présent sur la face  $\beta$  du ribonucléotide.
- Les cystéines 225 et 462, jouant le rôle de groupes redox actifs.
- Le glutamate 441, servant comme accepteur de protons lors de la catalyse.



**Figure 21** : Mécanisme proposé par Stubbe et al., 1995 pour la réduction des ribonucléotides.

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le radical libre  $X^\circ$  sur le site actif de la protéine arrache l'hydrogène Ha en 3' du ribose, donnant un radical en 3'. Cet intermédiaire radicalaire est activé par la liaison hydrogène entre le groupement OH en 3' et un groupement carboxylate, le Glu 441. Après la protonation du groupement OH en 2' par une des cystéines, on a départ d'une molécule d'eau. Le nouvel intermédiaire radicalaire reçoit un atome d'hydrogène des deux cystéines donnant ainsi un 3'-cétodésoxyribonucléotide. La réduction de ce dernier par le radical anion disulfide et le retour de l'hydrogène Ha en position 3' complètent la synthèse du désoxyribonucléotide avec le retour du radical initial  $X^\circ$  du site actif et formation de disulfide. Ce dernier doit être réduit pour un nouveau cycle enzymatique.

### IV- INHIBITION DE LA RNR DE CLASSE I.

La RNR est une enzyme clef pour la biosynthèse de l'ADN. La réduction des ribonucléotides, durant la phase S du cycle cellulaire, est l'étape limitante de tout le processus et la régulation allostérique de l'holoenzyme fournit un important mécanisme de contrôle de la concentration intracellulaire des quatre désoxyribonucléotides (Reichard, 1988).

Il existe une excellente corrélation entre l'activité RNR et le taux de prolifération d'un tissu donné (Elford et al., 1970; Takeda et al., 1981). On observe une forte activité RNR dans les cellules embryonnaires, le thymus, dans les cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus...etc., par rapport à des lignées de cellules sauvages correspondantes (Lankinen et al., 1982). Par conséquent, l'inhibition de la RNR conduit à l'inhibition de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire. Cette enzyme est donc considérée comme une cible importante pour la recherche de molécules anticancéreuses, antibactériennes ou antivirales.

L'inhibition de la RNR peut se faire à trois niveaux:

- La protéine R1
- La protéine R2

- La formation du complexe R1:R2

### **IV-1 Cible protéine R1: Utilisation d'analogues de substrats.**

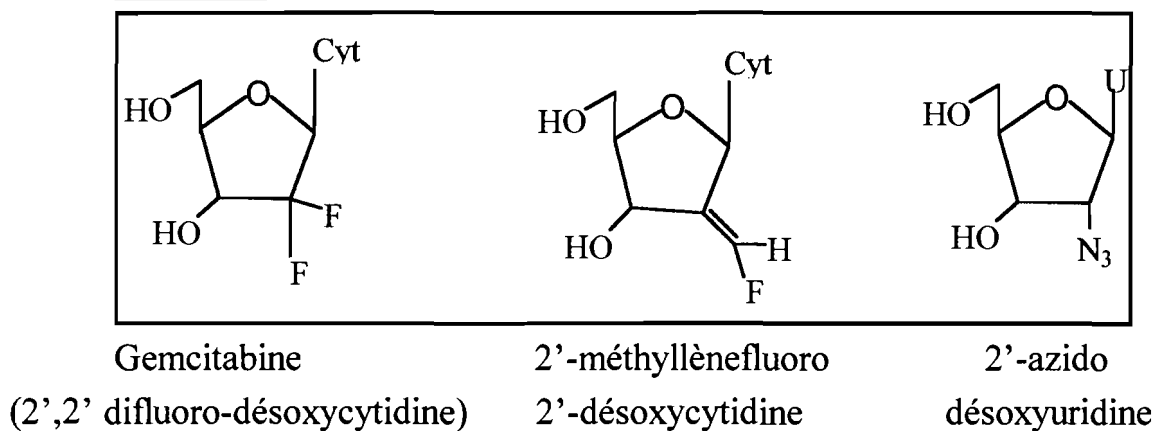
Nous avons évoqué précédemment la formation de radicaux intermédiaires sur la protéine R1, lors de la catalyse enzymatique, initiée par la fixation du substrat. Une stratégie d'inhibition de la RNR consiste à utiliser des analogues de substrat modifiés en 2' du ribose (par une fonction halogène, fluorométhylène, thiol ou azido), (figure 22), lesquels se fixent sur la protéine R1, et piègent ces intermédiaires radicalaires.

Ces inhibiteurs doivent être des nucléotides, mais les médicaments administrés sont des nucléosides (parce que les nucléotides ne sont pas capables de traverser les membranes cellulaires), qui peuvent ensuite être phosphorylés dans la cellule.

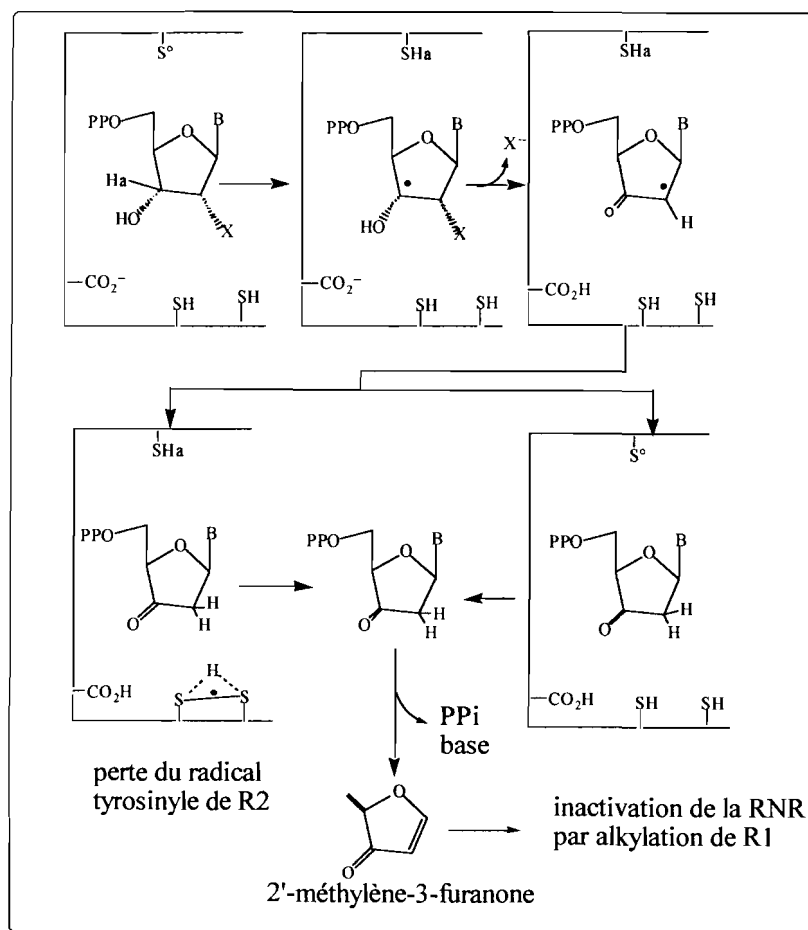
Cette approche est très prometteuse, car elle a déjà permis la mise au point de plusieurs agents antitumoraux. Deux analogues de substrat, la gemcitabine (2',2''- difluorodésoxycytidine, dFdC) (Hertel et al., 1988; Abbruzzese et al., 1991) et le (E)-2'-méthylène-fluoro-2'-désoxycytidine ((E)-FMC) (Kanazawa et al., 1995; McCarty et al., 1995) (figure 22) sont actuellement utilisés en clinique pour le traitement des tumeurs solides de la prostate et du sein.

## INTRODUCTION GENERALE

**Figure 22:** Quelques analogues de nucléosides.



Le mécanisme responsable de l'inactivation de l'enzyme est représenté dans la figure 23 (Stubbe et al., 1995).



**Figure 23:** Mécanisme d'inhibition de la RNR par un analogue de nucléotide.

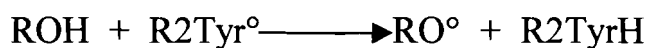
Après le départ du groupe partant, X, on a la formation d'un radical 2'-désoxy-3'-cétonucléotide, lequel peut être réduit, soit par la paire de cystéines située sur la face  $\alpha$  du ribonucléotide (Cys 225 et 462), soit par la cystéine 439. Dans le premier cas, le radical thiyle sur la cystéine 439 n'est pas reformé, ce qui conduit à la perte du radical tyrosinyle de la protéine R2. Dans les deux cas, le produit de décomposition final de l'inhibiteur, le 2-méthylène-3-furanone, se dissocie du site actif, et inactive de façon irréversible la RNR, par alkylation non spécifique sur la protéine R1 (cela peut être détecté par l'absorbance à  $\lambda=320\text{nm}$ ) (Moore et al., 1989).

### IV-2 Cible: la protéine R2.

#### a) Les piègeurs de radicaux.

Des piègeurs de radicaux tels que les polyphénols, les p-alkoxyphénols, l'hydroxyurée réagissent en donnant un atome d'hydrogène au radical tyrosinyle de la protéine R2, la transformant en metR2 (forme inactive), dans laquelle on a toujours le centre ferrique, mais pas le radical ou en apoR2 dans laquelle les deux cofacteurs sont absents (Lassman et al., 1992; Karlsson et al., 1992; Nyholm et al., 1993).

Ces réducteurs sont supposés réagir directement ou indirectement avec le radical tyrosinyle dans une étape de réaction comme l'indique l'équation:



où  $\text{R2Tyr}^\circ$  est le radical tyrosinyle de R2.

L'hydroxyurée est l'inhibiteur de la RNR le plus connu. Il est utilisé en clinique comme agent anticancéreux. Récemment, l'intérêt pour cette molécule s'est accru dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments contre le VIH (SIDA). Des études ont montré que la combinaison de l'hydroxyurée et l'AZT (3'-

azido-3'-désoxythymidine) ou le ddI (2',3'-didésoxyinosine) avait des effets synergiques antiviraux très importants (Lori et al., 1994; Malley et al., 1994; Gao et al., 1995).

Malheureusement, l'hydroxyurée provoque une inhibition seulement réversible de la RNR, étant donné que la forme metR2 peut être réactivée par le système enzymatique de la flavine réductase (Fontecave et al., 1987 et 1989). Au fil du temps les cellules développent une certaine résistance à la drogue. De fortes doses, éventuellement toxiques, sont donc requises. Il devient de ce fait nécessaire de rechercher de nouveaux inhibiteurs de la ribonucléotide réductase, moins toxiques et beaucoup plus efficaces.

Les p-alkoxyphénols sont une nouvelle classe d'inhibiteurs de la RNR de mammifères (Pötsch et al., 1994 et 1995). L'agent le plus performant, le p-propoxyphénol, inactive la protéine R2 de mammifère 215 fois plus efficacement que celle d'*E. coli*. Chez les mammifères, le taux de réduction du radical tyrosinyle de R2 augmente significativement avec la taille de la chaîne alkyle hydrophobe de ces inhibiteurs (Pötsch et al., 1994), observation qui peut être importante pour établir un modèle de molécules anti-prolifératives.

Des études sur la protéine R2 avec des inhibiteurs tels que l'hydroxyurée pour la protéine R2 de souris (Nyholm et al., 1993) et le catéchol pour celle du virus de l'herpès (Atta et al., 1993), ont montré que la réduction du radical tyrosinyle était accompagnée par la réduction et la perte du centre ferrique de ces deux protéines.

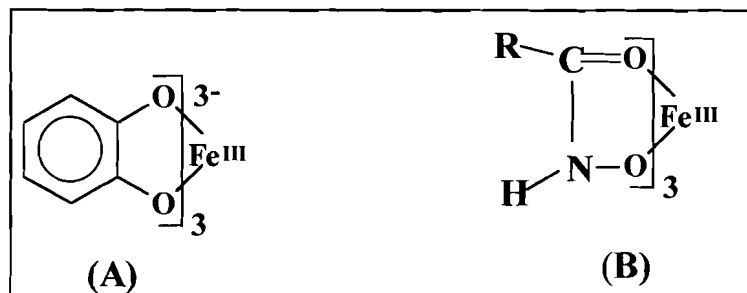
### **b) Les chélateurs de fer.**

Nous avons souligné que le centre diferrique de R2 était impliqué dans l'activation de la protéine. Les agents complexants ou chélateurs sont donc des inhibiteurs potentiels de la RNR.

## INTRODUCTION GENERALE

Il a été montré que l'inhibition pouvait se faire selon deux mécanismes :

- Des chélateurs puissants de fer comme la 1-formyl-isoquinoline thiosemicarbazone (Liu et al., 1996) ou le 2,2'-bipyridyl-6-carbothiamide (Nocentini et Barzi, 1997) sont capables de chélater le fer de la protéine et de détruire en même temps le radical tyrosinyle. D'autres agents, comme le 1,2-dihydroxybenzène (Catéchol), ou les acides hydroxamiques, possédant des groupements fonctionnels ortho-dihydroxyls, à la fois réducteurs et complexant, sont également capables de former avec le fer de la protéine des complexes fer-catécholates (Swarts et al., 1995).



**Figure 24** : (A) complexe fer-catécholates ;(B) complexation du fer par les acides hydroxamiques.

- Le rôle de la RNR dans l'inhibition de la croissance de cellules de mammifères par de potentiels chélateurs du fer a été étudié par Nyholm et al., 1993. Cette étude a montré qu'in vivo deux chélateurs du fer, la parabactine et la desferrioxamine, inhibaient la croissance cellulaire, et que cette inhibition était réversible par addition de fer. Des expériences in vitro, utilisant de la protéine recombinante R2 de souris marquée au <sup>59</sup>Fe, montrent que le centre ferrique est labile à température physiologique, ce qui conduit à une perte spontanée de fer même en absence de chélateurs. La parabactine et la desferrioxamine inhibent la ribonucléotide réductase et la croissance cellulaire, non pas en attaquant directement les centres redox de la

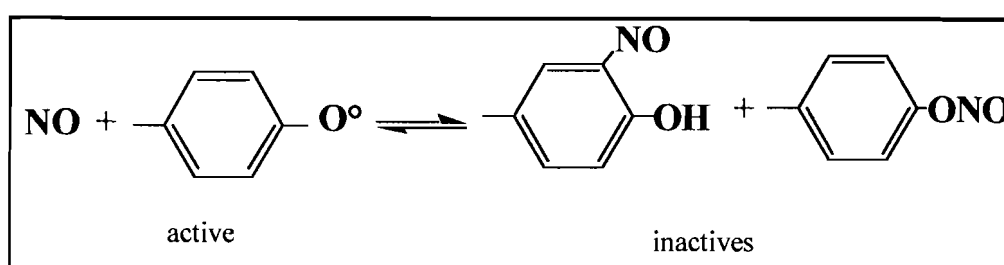


protéine R2, mais en chélatant le pool intracellulaire de fer des cellules. Cette action empêche l'incorporation du centre diferrique-radical tyrosinyle dans les molécules d'apoprotéine R2 et donc l'activation de la protéine R2.

### c) Les thionitrites en tant que donneurs de NO.

Un réducteur du radical tyrosinyle, et qui possède de nombreux rôles physiologiques, est l'oxyde nitrique NO. Il joue par exemple le rôle de médiateur de l'effet cytotoxique des macrophages activés dans les cellules tumorales, en inhibant leur réplication (Lepoivre et al., 1994).

Connaissant la réactivité de NO pour les thiols (Girad et al., 1993), les radicaux (Koppenol et al., 1992; Padmaja et al., 1993) et les métaux de transition (Henry et al., 1993), la ribonucléotide réductase contient au moins 3 structures pouvant être des cibles potentielles pour NO, à savoir les cystéines du site actif de la protéine R1, le radical tyrosinyle et le centre binucléaire ferrique.



**Figure 25:** Inactivation de la protéine R2 par NO.

En effet, il a été montré que NO réagit efficacement avec le radical tyrosinyle de la protéine R2, à travers une réaction de couplage radical-radical (Lepoivre et al., 1994; Roy et al., 1995). Mais le complexe formé tyrosine-NO est capable de se dissocier lentement pour redonner le radical tyrosinyle, lorsque NO disparaît progressivement dans la solution (Eiserich et al., 1995).

La réaction de couplage entre NO et le radical tyrosinyle est réversible, et l'équilibre entre la forme active et la forme inactive de la protéine R2, est contrôlé par la concentration en NO (Lepoivre et al., 1994 ; Roy et al., 1995).

### **IV-3 Inhibition de l'interaction R1:R2.**

Toutes les RNRs de classe I ont une structure quaternaire  $\alpha_2\beta_2$ , où l'activité enzymatique dépend de la formation du complexe entre les deux sous-unités homodimériques R1 et R2. La constante d'affinité de cette action est de  $0,5-1.10^7 \text{ M}^{-1}$  chez *E. coli* (Climent et al., 1991).

Des études cinétiques de l'association des deux sous-unités R1 et R2 d'*E. coli*, comparée à celle de R1 avec la protéine R2 tronquée dans sa partie C-terminale, indiquent que l'interaction entre R1 et R2 s'effectue par la séquence C-terminale de R2 (Climent et al., 1991). En effet, des peptides synthétiques, identiques à la séquence C-terminale de R2, sont capables d'inhiber l'activité ribonucléotide réductase, par compétition avec R2 pour la fixation sur la protéine R1.

Ce phénomène a été observé pour la première fois avec la RNR du virus de l'Herpès où un nonapeptide acétylé (AcYAGAVVNDL) inhibait l'activité réductase, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 10-20  $\mu\text{M}$  (Dutia et al., 1986; Cohen et al., 1986; McClements et al., 1988). Le peptide AcNSFTLDADF, correspondant à la partie C-terminale de la protéine R2 de souris, inhibe la RNR des mammifères avec un IC<sub>50</sub> de 20  $\mu\text{M}$  (Yang et al., 1990).

Les peptides C-terminaux dérivant de la protéine R2 d'*E. coli*, de mammifères ou de virus, inhibe uniquement les RNRs de leurs espèces respectives (Cosentino et al., 1991). D'où l'intérêt d'utiliser ces peptides synthétiques pour une inhibition spécifique de la RNR.

### VII- But de cette étude.

Nous venons de voir que la ribonucléotide réductase était une enzyme vitale pour tout organisme vivant, car elle catalyse la première étape clef de biosynthèse de l'ADN, processus lié à la prolifération cellulaire. Cette enzyme possède un cofacteur indispensable à l'activité enzymatique : le radical tyrosinyle de la sous-unité R2, qui, nous venons de le voir, peut être la cible d'agents anti-oxydants tels que l'hydroxyurée, les polyphénols..etc, conduisant à l'inactivation de l'enzyme.

□ Pour améliorer l'efficacité de ces inhibiteurs, dans le cadre du contrôle de l'activité réductase, il est important de comprendre la relation structure-réactivité du site radicalaire. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes proposés de modifier l'environnement de ce site par mutagenèse dirigée, pour mieux caractériser les résidus importants dans la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis d'agents chimiques et les paramètres contrôlant cette réactivité ; l'objectif étant d'une part de savoir si les transferts d'électrons entre ces molécules et le radical se font de façon directe ou à longue distance, et d'autre part de déterminer un modèle pour la synthèse de nouvelles molécules chimiques ciblées sur le radical tyrosinyle.

□ Dans la seconde partie de ce travail, après avoir purifié et caractérisé de nouvelles protéines R2 (*M. tuberculosis*, *P. falciparum*), nous avons comparé la réactivité du radical tyrosinyle de ces protéines avec celles d'autres espèces (*E. coli*, *A. thaliana* et souris), afin d'identifier des inhibiteurs spécifiques, qui pourraient plus tard être utilisés comme agents anti-prolifératifs sélectifs.

**MATERIELS ET METHODES**

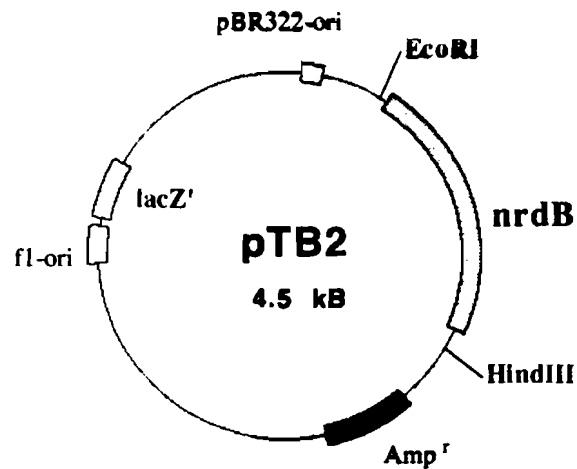
## MATERIELS ET METHODES

---

## I-Matériel biologique.

### I-1- Plasmides.

**Le plasmide pTB2** (figure I-1), contenant le gène *nrdB*, codant pour la protéine R2 nous a été offert par le Pr. B-M Sjöberg (Departement of Molecular Biology Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, Sweden). Il est issu du phagemide pTZ18R auquel on a inséré un fragment d'ADN contenant le gène *nrdB*.



**Figure I-1** : Plasmide pTB2.

**Le plasmide pVNR2**, a été construit par clonage du fragment EcoRI-HindIII de pTB2 dans le vecteur de surexpression **pJF119EH**, un dérivé du plasmide **pKK223-3** qui possède un site de multiclonaage, encadré d'un côté par le promoteur *tac* inductible à l'isopropylgalactoside (IPTG), et de l'autre côté par deux forts terminateurs transcriptionnels.

## MATERIELS ET METHODES

**Bactériophage M13** : l'ADN du bactériophage M13 existe sous deux formes distinctes au cours de son cycle infectieux : une forme simple brin dans les particules pHagiques et double brin au sein des cellules infectées. La forme double brin, également appelée forme répliquative (RF) est utilisée pour les clonages de gène. Le M13mp19 possède le site de multiclonage de pUC19 à l'extrémité 5' du gène codant pour la partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase. Après l'infection d'une souche appropriée par le M13mp19, les plaques de phages obtenues sont bleues en présence du substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactoside (Xgal) et d'IPTG dans le milieu de culture. L'insertion d'ADN dans le site de multiclonage supprime l' $\alpha$ -complémentation. Les plaques de M13 contenant le fragment d'ADN sont donc blanches. La forme simple brin est isolée à partir des particules de phages et est utilisée pour la mutagenèse.

### I-2- Les souches bactériennes.

Plusieurs souches d'*E. coli* ont été utilisées comme hôte pour le plasmide pTB2 et ses dérivés :

**TG1** : *SupE hsd  $\Delta$ 5 thi  $\Delta$ (lac-proAB)*, F'[*traD36proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15*]

TG1 possède un épisode (ou plasmide F') qui lui confère un caractère sexuel " mâle " par la présence de pili sexuels à sa surface. Ces pili permettent l'infection de la cellule par le phage M13. TG1 est utilisée pour l'obtention de l'ADN simple brin de M13.

**JM109** : *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi $\Delta$ (lac-proAB)*  
F'[*traD36proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15*]

JM109 est également utilisée pour les infections par le phage M13. Mais contrairement à TG1, JM109 sera utilisée pour des préparations d'ADN double brin de M13.

**CJ236** : *dut1 ung1 thi-1 relA1/pCJ105(cam<sup>r</sup> F')*

## MATERIELS ET METHODES

---

Cette souche sert à produire l'ADN simple brin du phage M13, utilisé pour la mutagenèse dirigée, selon la méthode de Kunkel. La mutation *dut* affecte l'activité d'UTPase de la cellule et la mutation *ung* inactive l'uracile-N-glycosylase, qui normalement élimine l'uracile incorporé par erreur dans l'ADN. La combinaison de ces deux mutations induit une incorporation d'uraciles dans l'ADN à la place de la thymine. La croissance de CJ236 en présence de chloramphénicol, permet de sélectionner les cellules contenant l'épisome F'.

**DH5 $\alpha$**  : Cette souche d'*E. coli* est utilisée pour des manipulations de routine telles les transformations, lorsque celles-ci ne nécessitent pas une souche particulière. En effet, DH5 $\alpha$  présente un taux de transformation élevé.

**K12** : La surproduction des protéines mutantes R2 a été effectuée dans la souche K12 d'*E. coli*.

**C600** : *Sup E44 hsdR $\theta$ 1-thr-1leuB6lacY1onA21*

Cette souche d'*E. coli* est utilisée pour la surproduction de la protéine R1.

**BL21(DE3)** : *hsdSgal( $\lambda$ cIts857ind1Sam7nin5lacUV5-17gene1)*

Le bactériophage DE3 est un dérivé du phage  $\lambda$  qui possède la région immunitaire du phage 21 et qui porte un fragment d'ADN contenant le gène *lac I*, le promoteur lac UV5 inductible par l'IPTG et le gène de l'ARN polymérase de T7. Ce fragment est inséré dans le gène *int* (intégration) du chromosome de la cellule hôte. Cette inactivation du gène *int* permet le maintien stable de DE3 dans le chromosome de la cellule. Ce système est utilisé pour la surproduction de gènes placés sous le contrôle du promoteur fort T7.



### **I-3- Les lignées cellulaires.**

Les cellules leucémiques lymphoblastiques de souris L1210-R2, dans lesquelles l'expression de la protéine R2 a été amplifiée 15 à 20 fois par rapport à la lignée cellulaire parentale L1210 (Lepoivre et al., 1994), ont été utilisées pour le test de l'activité ribonucléotide réductase. Les cellules leucémiques myélogéniques humaines K-562 et celles mastocytoplasmiques de souris P-815 ont été utilisées pour le test d'incorporation de la  $^3\text{H}$ -Thymidine dans l'ADN. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu KPMI 1640, dans lequel on a ajouté des antibiotiques, 5% de sérum de fœtus de veau inactivé par la chaleur (Gibco BRL Sarl, Cergy-pontoise, France), et du tampon HEPES 25mM, pH=7,4.

### **I-4- Milieux de culture.**

Les milieux de culture utilisés sont le milieu complet LB (liquide et solide Luria Bertani) le milieu LB top agar et le milieu minimum M19. La composition de ces milieux a été décrite en détail (Sambrook et al., 1989).

## **II- Méthodes de biologie moléculaire.**

### **II-1- Préparation des cellules compétentes.**

Une culture sur la nuit à 37°C est d'abord effectuée dans 25 ml de LB. Elle est ensuite diluée pour obtenir une D.O600 = 0,1 dans 100 ml de LB, et la croissance des cellules est effectuée jusqu'en phase exponentielle de croissance (D.O600 = 0,7). Après centrifugation à froid, les cellules sont resuspendues dans 50 ml de  $\text{MgCl}_2$  0,1 M, centrifugées à nouveau puis remises dans 50 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M et incubées pendant 90 minutes dans la glace. Les cellules sont à nouveau centrifugées et resuspendues dans 1,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1

## MATERIELS ET METHODES

---

M, 15 % de glycérol. Les cellules compétentes sont ensuite aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

### **II-2- Transformation de bactéries.**

On ajoute dans un tube Eppendorf, contenant 200µl de cellules compétentes, 5 à 10 ng de plasmide. On laisse incuber dans la glace pendant 45 min. Puis les cellules subissent un choc thermique à 42°C, pendant 90 secondes. Le tube est placé dans la glace pendant 5 min. Après addition de 0,5 ml de LB pour permettre d'exprimer la résistance à l'antibiotique, le tube est incubé à 37°C pendant une heure. 200µl de cellules sont alors étalés sur une boîte de Pétri contenant de l'ampicilline (100µg/ml). La boîte est incubée à 37°C sur la nuit.

### **II-3- Transfection.**

Un tube Eppendorf contenant 200µl de cellules compétentes TG1 et 5µl d'ADN de phage à la dilution appropriée est placé 35 min dans la glace, puis 90 secondes à 42°C. Le mélange de transfection est alors transféré dans 2,5 ml de top agar maintenu liquide, à 42°C au bain-marie, avec 40µl de Xgal (20mg/ml), 20µl d'IPTG (20mg/ml) et 200µl de cellules TG1 en phase exponentielle de croissance. Le top agar est ensuite déposé sur une boîte de pétri. Après solidification, les boîtes sont incubées à 37°C. Les plaques de phages apparaissent après 8 à 12 heures d'incubation.

### **II-4- Purification d'ADN plasmidique.**

5 ml de milieu LB, contenant de l'ampicilline (50µg/ml), sontensemencés avec une colonie, et incubés sur la nuit sous agitation (200 r.p.m). Les bactéries (2×1,5ml) sont collectées par 5 min de centrifugation à 12 000 g. Le culot est resuspendu dans 1ml de tampon STE (NaCl 0.1M, Tris-HCl 10mM

## MATERIELS ET METHODES

---

pH8, EDTA 1mM pH8), puis centrifugé de nouveau 5 min à 12000 g et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 100 µl de Solution I (glucose 50mM, Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM pH8) en vortexant, puis 200 µl de Solution II (NaOH 0.2N, SDS 1%) sont ajoutés. Le mélange se fait par inversions répétées du tube, qui est ensuite placé dans la glace 5 min. Le lysat est neutralisé par addition de 150 µl de Solution III (60ml d'acétate de potassium 5M, 11.5ml d'acide acétique, et 28.5 ml d'eau). Le tube est vortexé et incubé dans la glace pendant 10 min afin de précipiter l'ADN chromosomique et les protéines dénaturées. On centrifuge 15 min à 12.000g et le surnageant est prélevé. L'extraction se fait avec 450 µl d'une solution de phénol-chlorophorme 1 : 1. Le mélange, réalisé au vortex pendant 1min, est centrifugé à 12000 g pour séparer les deux phases. La phase aqueuse, contenant l'ADN, est prélevée et précipitée avec 1,2 ml d'éthanol 95% froid. Après une centrifugation, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%, séché, et l'ADN est resuspendu dans 30-50 µl de tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) contenant de la RNAase (20µg/ml) et conservé à -20°C.

### **II-5- Purification d'ADN simple brin du phage M13.**

L'ADN simple brin est obtenu à partir des particules de phages libérées dans le milieu de culture des cellules infectées. 2 ml de milieu LB sont inoculés à 1% avec des cellules TG1 en phase stationnaire. Cet inoculum est infecté avec une plaque de phages piqués sur une boîte. Après 6 h d'incubation en agitation rapide à 37°C, les cellules sont culottées à 11000 g 5 min. Le surnageant contenant les particules phagiques est récupéré et additionné de 150 µl de polyéthylèneglycol (PEG) 20 % NaCl 2,5 M. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les phages sont précipités par 5 min de centrifugation à 11000 g. Après avoir éliminé le PEG résiduel, les phages sont resuspendus dans 100 µl de tampon TE, puis extraits avec 50 µl de pHénol-chlorophorme-alcool isoamylique (rapport 25:24:1). La phase aqueuse est récupérée et additionnée de 2 volumes de solution de précipitation d'ADN (70% EtOH

## MATERIELS ET METHODES

---

contenant de l'acetate de sodium 3M pH5,2). Après 30 min d'incubation dans la glace, l'ADN est culotté 15 min à 13 000xg à 0°C Les tubes sont séchés sous vide 1 h au dessiccateur et les culots d'ADN simple brin sont finalement resuspendus dans 25 µl de tampon TE.

### **II-6- Purification d'ADN double brin du phage M 13.**

Pour cette préparation, la souche utilisée est JM109. 100 ml de milieu LB sont inoculés à 1% avec des cellules JM109 en phase stationnaire et infectées avec une plaque de phages. La culture est placée 6 h à 37°C en agitation rapide. 30 ml de culture sont récupérés et les cellules sont culottées à 5500 g 15 min. Le culot est lavé avec 8 ml de Tris-acétate 100 mM/NaCl 200 mM pH 8 et recentrifugé. Les cellules sont remises en suspension vigoureusement dans 1 ml de Solution I, puis, 200 µl de RNase (4mg/ml) sont ajoutés. 2 ml de Solution II fraîchement préparée sont additionnés et le mélange est fait par inversions successives du tube. Finalement on ajoute 1,5 ml de Solution III. Après 5 min d'incubation dans la glace, le mélange est centrifugé à 13000 g pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et additionné de 0,7 volume d'isopropanol. Suite à une incubation de 10 min à température ambiante, on centrifuge 10 min à 13000 g. Le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 200 µl de TE. Puis 2 extractions avec phénol-chloroforme sont réalisées. L'ADN de la phase aqueuse est précipité, séché, puis resuspendu dans 50 µl de TE.

### **II-7- Digestion d'ADN.**

Classiquement, 1 µl (0,25 µg) de préparation de plasmide est digéré avec 5 unités de chacune des enzymes de restriction dans un volume réactionnel final de 10 µl, contenant 1 µl du tampon de réaction 10X adapté. La réaction se fait à 37°C, 1 h 30. On analyse la digestion par électrophorèse sur un gel d'agarose

à haut point de fusion à 1 % dans du tampon TAE (40 mM Tris acétate/1mM EDTA) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (B.E.T) (le B.E.T est un intercalant de l'ADN qui sous U.V. fluoresce). Le mélange réactionnel est déposé dans les puits du gel après lui avoir ajouté 2 µl de tampon de charge (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% Xylène cyanol, 30% glycérol). On fait migrer les brins d'ADN par électrophorèse (U = 70 mV) et ceux-ci sont ensuite visualisés sous U.V. Les enzymes de restriction et les tampons de réaction sont de chez Boehringer ou de chez Eurogentec.

### II-8- Sous-clonage.

- Digestion, séparation et isolement d'un fragment d'ADN :

Après la réalisation de la mutation dans le phage M13 ou par PCR, le gène modifié est sous-cloné dans un vecteur de surexpression. 20 µl d'ADN double brin de phage M13 recombinant mutés sont digérés avec des enzymes de restriction appropriées, dans les conditions décrites plus haut, adaptées à un mélange réactionnel de 40 µl. Le mélange réactionnel est incubé 4 h à 37°C. 8 µl de tampon de charge sont ajoutés. Dans le cas de la mutagenèse par PCR, le produit PCR contenant la mutation (40 µl) est digéré par les enzymes de restriction pendant 4 heures à 37°C dans un volume final de 50 µl et 10 µl de tampon de charge sont ajoutés.

Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. Le gel est à 1% en agarose à bas point de fusion dans du tampon 1X TAE et contient 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Après une migration de 4 h à 4°C sous une tension de 60V dans du tampon TAE, l'insert est récupéré par découpage d'une bande de gel correspondant au fragment d'ADN visualisé sous U.V.

Cette bande d'agarose est solubilisée dans 300 µl de TE pendant 10 min au bain marie. L'agarose est ensuite éliminé par deux extractions au phénol puis une extraction au phénol-chloroforme. La phase aqueuse contenant l'insert, est concentrée au butanol jusqu'à un volume de 100 µl. Le fragment d'ADN est précipité et resuspendu dans 20 µl de TE.

## MATERIELS ET METHODES

---

Le vecteur, préalablement digéré par les enzymes de restriction appropriées et purifié sur gel, est déphosphorylé par la phosphatase alcaline (1 U/ $\mu$ l de vecteur) pendant 1 h à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par incubation 15 min à 67°C. Le vecteur et l'insert sont mis en présence dans des rapport insert/vecteur allant de 1 à 4. La ligation est réalisée par l'ADN ligase du phage T4 (1U pour un volume réactionnel de 10  $\mu$ l) à 11°C pendant une nuit. Une transformation est ensuite réalisée avec 8  $\mu$ l du mélange de ligation dans DH5 $\alpha$  ( ou JM109 si le vecteur est le phage M13 double brin). La phosphatase alcaline et l'ADN ligase du phage T4 sont de chez Boehringer.

- Obtention et vérification des produits de sous-clonage.

Les plasmides issus de plusieurs colonies de la boîte de transformation sont préparés selon la méthode de purification décrite plus haut et analysés par digestion avec les enzymes de restriction appropriées. Un plasmide est choisi parmi ceux présentant le profil de restriction attendu.

### **II-9- Mutagenèse dirigée.**

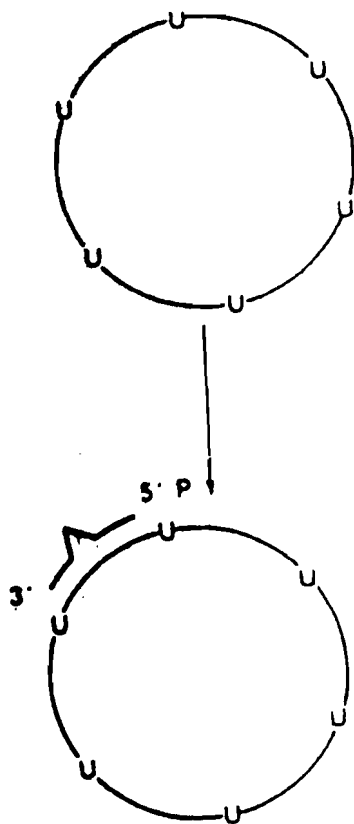
#### **II-9-1- Oligonucléotides utilisés.**

Les mutants L77F, V136R, V136N et I74F ont été construits par la méthode PCR et nécessitent 2 oligonucléotides complémentaires portant la mutation. La méthode de Kunkel, avec des oligonucléotides dégénérés, a été utilisée pour les mutants I74R et I74K. Les oligonucléotides utilisés pour cette étude ont été synthétisés à l'Institut Pasteur et sont décrits dans le tableau ci-dessous.

## MATERIELS ET METHODES

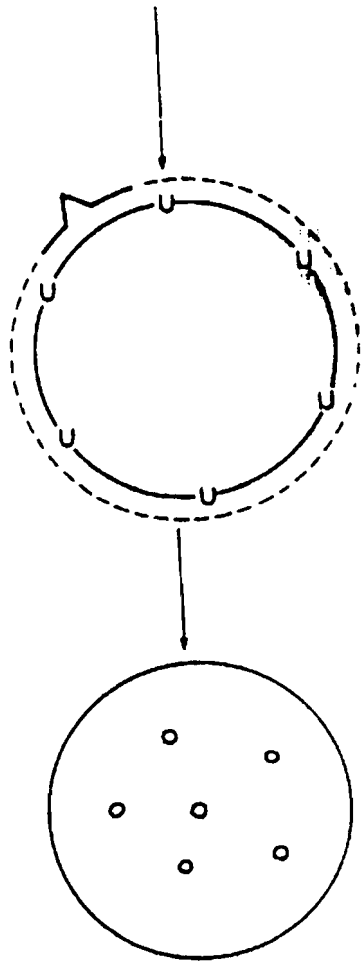
Positions	Séquence des oligonucléotides	Codons modifiés	Mutations
77	5'-CGTCTGATATTTAAAGTTCGT-3' 5'-AGCAACTTTAAATATCAGACG-3'	GTC → TTT	Leu → PHe
136	5'-ATCGTCAAAGCTAACAGA-3' 5'-TCTGTTAGCTTTGACGAT-3'	GTG → AGG	Val → Arg
136	5'-GTCAAAGTTAACAGACGG-3' 5'-CCGTCTGTTAACTTTGAC-3'	GTG → AAC	Val → Asn
74	5'-CAGGTTGCTGAAAAAGATGTG-3' 5'-CACATCTTTTCAGCAACCTG-3'	ATC → TTC	Ile → PHe
74	5'-GTTGCTCYTAAAGATGTG-3'	ATC → AAG	Ile → Lys
74	5'-GTTGCTCYTAAAGATGTG-3'	ATC → AGG	Ile → Arg

### II-9-2- Méthode de Kunkel.



a) Phosphorylation des oligonucléotides. Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée doivent être phosphorylés en 5'. 1µl d'oligonucléotide à 0,1 µg/ml dans 1µl de tampon de phosphorylation 10x, 4µl d'ATP 5mM et 3µl d'eau sont incubés 30 min à 37°C avec 10U de T4 polynucléotide kinase. La solution est ensuite placée 10 min à 70°C pour inactiver l'enzyme.

## MATERIELS ET METHODES



b) Hybridation : 60 ng d'oligonucléotides phosphorylés portant la mutation sont incubés avec 0,5  $\mu\text{g}$  d'ADN simple brin de M13, 1  $\mu\text{l}$  de tampon d'hybridation 10x et 6,5  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Le mélange est placé dans de l'eau à 70°C suivi d'un lent retour à la température ambiante.

c) Elongation-ligation : Elle est réalisée par l'ADN polymérase du phage T4 (2U) et la T4 DNA ligase (1U). En présence de 2  $\mu\text{l}$  de dNTPs (5mM) et 2  $\mu\text{l}$  d'ATP (5mM). Le mélange est incubé pendant 5 min dans la glace, 5 min à 25°C, 90 min à 37°C, puis 5 min à 70°C.

d) Transfection : 5  $\mu\text{l}$  du mélange d'élongation-ligation sont utilisés pour une transfection dans des cellules TG1 (*dut<sup>+</sup> ung<sup>+</sup>*) pour le séquençage, ou dans des cellules JM109 (*dut<sup>+</sup> ung<sup>+</sup>*) pour le sous-clonage. Selon la souche utilisée, les plaques de phages obtenues contiendront majoritairement l'ADN simple brin (TG1) ou l'ADN double brin (JM109) portant la mutation.

Tampon de pHosphorylation 10 X		Tampon d'hybridation 10 X		Tampon d'élongation 10 X	
Tris-HCl pH 7,5	500 mM	Tris-HCl pH 7,5	200 mM	Tris-HCl pH 7,5	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	EDTA pH 8	20 mM	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
DTT	20 mM	NaCl	500 mM	DTT	20 mM



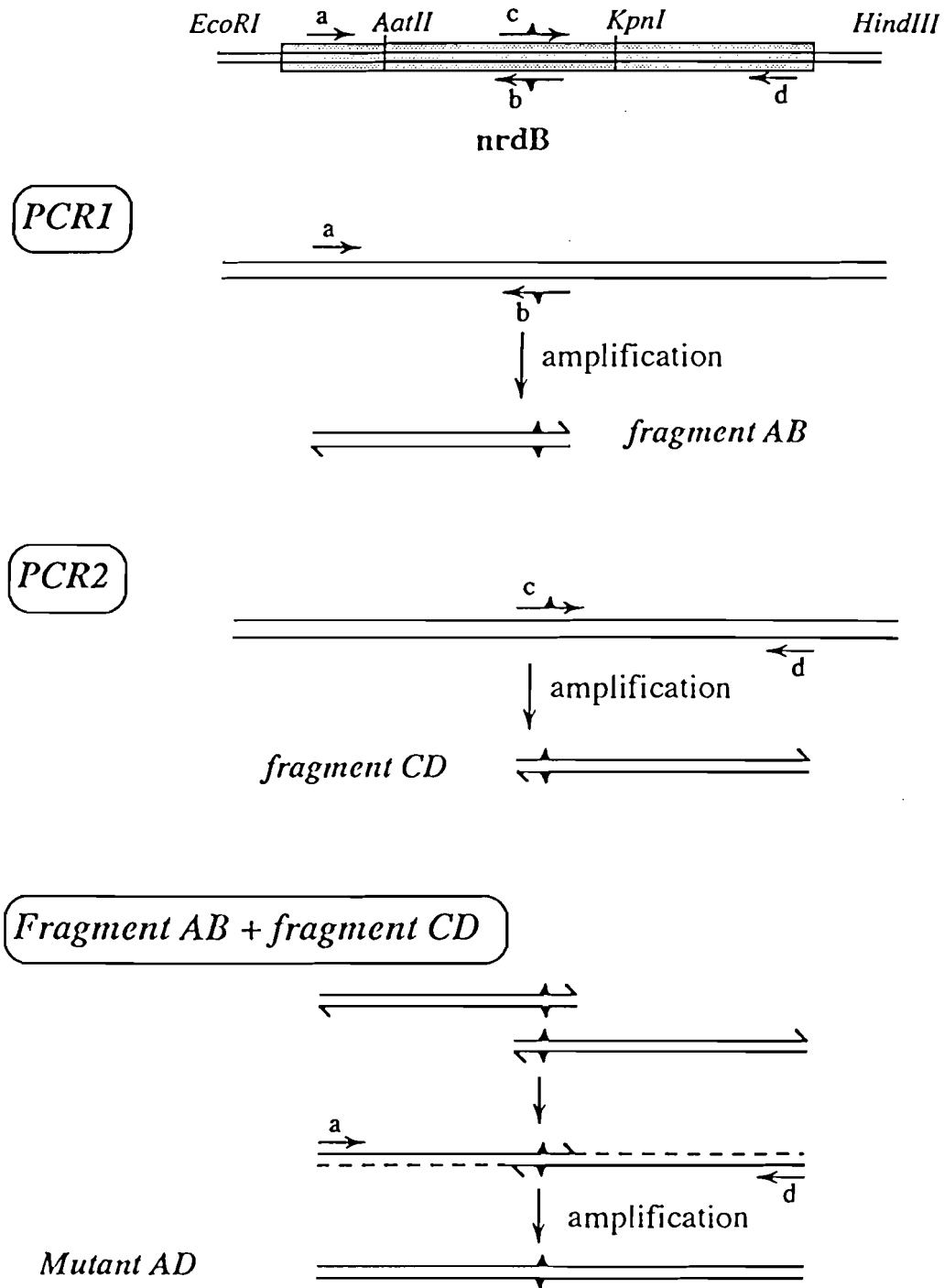
### II-9-3- Mutagenèse dirigée par PCR.

La méthode utilisée pour introduire les mutations L77F, I74F, V136R et V136N dans le gène *nrdB* codant pour R2 est celle décrite par Ho et al., 1989. Elle se fait en trois étapes de PCR, et utilise 2 amorces complémentaires contenant la mutation désirée notée b et c (figure II-1) et 2 amorces “ flanking primers ” a et d qui introduisent des sites de restriction enzymatiques, permettant le sous-clonage ultérieur de produits PCR contenant la mutation.

#### Préparation de la matrice :

0,5µg de pTB2 sont digérés par l'enzyme Hind III pendant 2h à 37°C. Le plasmide linéarisé est récupéré sur un gel d'agarose de préparation à bas point de fusion à 1% et purifié selon la méthode décrite par ailleurs (matériels et méthodes paragraphe II-8).

MATERIELS ET METHODES



**Figure II-1** : Méthode de mutagenèse dirigée par PCR.

## MATERIELS ET METHODES

### 1<sup>ère</sup> étape de PCR :

Le premier fragment contenant la mutation est noté AB. Il est synthétisé et amplifié dans une 1<sup>ère</sup> étape de PCR utilisant les amorces a et b (figure II-1).

### 2<sup>ème</sup> étape de PCR :

Le second fragment contenant la mutation est noté CD. Il est synthétisé et analysé dans une étape de PCR, utilisant les amorces c et d (figure II-1).

Les deux étapes de PCR utilisent le protocole suivant :

- dans des tubes séparés, on mélange les réactifs pour les différentes PCR 1 et 2 pour préparer les fragments AB et CD.

Produits de PCR	1 AB	2 CD
Composés : matrice	pTB2 HindIII 20 ng	pTB2 HindIII 20 ng
1 <sup>ère</sup> amorce	a 500 ng	c 500 ng
2 <sup>ème</sup> amorce	b 500 ng	d 500 ng
10x tampon de réaction	10 µl	10 µl
10x dNTPs (1)	10 µl	10 µl
H <sub>2</sub> O	jusqu'à 100 µl	jusqu'à 100 µl

(1) mélange de 2 mM de chaque dNTP.

- La solution est recouverte de quelques gouttes d'huile minérale (Sigma) et le programme suivant est lancé : après une première dénaturation, à 94°C pendant 5 min, on ajoute dans chaque tube 0,5µl de Taq DNApolymérase. Ensuite, 25 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 2 min et une polymérisation à 72°C pendant 2

## MATERIELS ET METHODES

---

min sont effectués. La polymérisation dans le dernier cycle est maintenue pendant 10 min.

- 10µl des mélanges réactionnels sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.
- Les bandes correspondant aux fragments AB et CD sont alors récupérées à partir d'un gel d'agarose de préparation à 1% et purifiées suivant la méthode décrite par ailleurs (cf. paragraphe II-8).

### 3<sup>ème</sup> étape de PCR :

- 30 à 50 ng des fragments AB et CD sont alors combinés dans une 3<sup>ème</sup> PCR utilisant 500 ng des amorces a et d et le reste des réactifs comme précédemment (figure II-1).
- L'amplification du produit PCR (fragment AD) s'effectue selon le même programme que celui décrit précédemment.
- Le fragment AB contenant la mutation est alors analysé sur gel d'agarose 1% et récupéré par la méthode décrite au paragraphe II-8. Un séquençage du fragment permet de vérifier la présence de la mutation et l'absence d'erreurs dans la séquence.

### Sous clonage du produit de PCR muté :

Le fragment AD purifié est alors digéré par les enzymes AatII et KpnI, et l'insert de 357 paires de bases contenant les mutations est sous cloné dans le vecteur pVNR2 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. Après ligation et transformation de cellules compétentes DH5α, on prépare des minipréparations de plasmide à partir des colonies obtenues, pour identifier les clones positifs.

## II-10-Séquençage d'ADN.

### II-10-1-Méthode de Sanger.

La technique de séquençage utilisée est celle développée par Sanger (Sanger et al., 1997). L'élongation à partir d'une amorce est réalisée en présence des dNTPs mais également d'un ddNTP. Ce dernier, n'ayant pas de fonction OH en position 3' du ribose, arrête l'élongation lorsqu'il est incorporé. Il y a ainsi, génération de différents fragments dont les tailles dépendent du didésoxynucléotide utilisé. En réalisant les 4 réactions de séquences avec les 4 ddNTPs on peut obtenir, après séparation des fragments par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la séquence du brin matrice séquencé.

### II-10-2-Réaction de séquence

Les produits et réactifs utilisés proviennent du kit de séquençage "Sequenase DNA sequencing kit version 2" de United State Biochemical. Le  $^{35}\text{SdATP}$  (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) est obtenu chez NEN. Les oligonucléotides amorces ont été synthétisés par l'Institut Pasteur, voir section II-9-1.

L'élongation se fait à partir d'une amorce complémentaire d'une séquence se trouvant en aval de la région à séquencer. L'hybridation est réalisée avec 1  $\mu\text{l}$  (0,4 mole) d'amorce et 5  $\mu\text{l}$  (0,5  $\mu\text{g}$ ) d'ADN matrice simple brin M13 recombinant dans 2  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction 10X du kit et 2  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Le mélange est placé dans de l'eau à 70°C puis est laissé à refroidir lentement jusqu'à température ambiante.

0,5  $\mu\text{l}$  de  $^{35}\text{SdATP}$  (5  $\mu\text{Ci}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de DTT 0,1M, 2  $\mu\text{l}$  de la solution de dNTPs et 2  $\mu\text{l}$  de sequenase (2U/ $\mu\text{l}$ ) sont ajoutés au mélange d'hybridation. Le mélange est incubé 5 min à 37°C. Puis, 3,5  $\mu\text{l}$  de ce nouveau mélange sont déposés dans 4 puits d'une plaque de microtitration notés "T", "C", "G", "A". Dans chacun de ces puits ont été ajoutés, au préalable, 2,5  $\mu\text{l}$  du mélange dNTPs/ddNTP correspondant. L'élongation dure 5 min à 37°C. La réaction est arrêtée par 4  $\mu\text{l}$  de formamide déposés dans chaque puits. La plaque de microtitration est placée 10 min à 90°C puis refroidie brutalement sur glace.

## II-10-3-Tampons, gel de séquence et migration

La Sequenase utilisée pour la réaction de séquence est stockée dans un tampon de dilution 50 % glycérol. L'utilisation d'un tampon d'électrophorèse tolérant le glycérol est donc obligatoire.

### Tampon de gel glycérol-tolérant 20 X (GTGB) :

Pour 1 litre 216 g Tris Base  
72 g Taurine  
4 g Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O qsp 1L. Le tampon est filtré.

### Le gel d'acrylamide 6% (quantité pour 100 ml) :

5,7 g acrylamide/ 0,3 bis acrylamide  
45 g Urée  
5 ml GTGB 20 X et H<sub>2</sub>O qsp 100 ml

Lorsque le gel est prêt à être coulé, on ajoute 1ml de persulfate d'ammonium 10% et 25 µl de Temed. La polymérisation dure 1 à 2 h. Le gel est préchauffé pendant 30 à 60 min avec une puissance limitante de 60 W. Le tampon d'électrophorèse utilisé est le GTGB 1X. Le gel est chargé avec 2 µl de chaque réaction de séquence par puits. La migration dure 90 à 180 min. Le gel est ensuite fixé 15 min dans l'acide acétique 10%/Ethanol 10%, transféré sur papier Whatman puis mis à sécher sous vide à 85°C 2h. Il est ensuite placé à autoradiographier pendant une nuit.

## III- Méthodes biochimiques.

### III-1-Préparation de la protéine R2 sauvage et des protéines R2 mutantes d'*E. coli*.

## MATERIELS ET METHODES

---

Les protéines R2, R2L77F, R2I74K, R2I74R, R2I74F, R2V136R et R2V136N ont été surexprimées par transformation des cellules *d'E.coli* K12 avec les vecteurs de surexpression pVNR2, pCG77, pCG74a, pCG74b, pCG74c, pCG136a et pCG136b . Ces plasmides sont dérivés du vecteur de surexpression pJF119EH dans lequel on a introduit le gène *nrdB* de R2 muté.

On fait pousser les cellules bactériennes dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (150µg/ml) et du sel de mohr 5µg/ml à 37°C. La croissance est mesurée en suivant l'absorbance à 600 nm. L'induction de la protéine R2 recombinante est faite par addition d'IPTG 1 mM à une DO<sub>600</sub>=0,6. Après 5 heures d'incubation à 37°C, on centrifuge la solution de bactéries à 700 r.p.m, 4°C, pendant 12 minutes. La méthode de purification utilisée s'inspire de celle décrite par Sjöberg et al., 1986.

### \* préparation des extraits

Après avoir lavé le culot de cellules avec du tampon Tris-Cl 0,1M, pH=9, on le resuspend dans le même volume de tampon Tris-Cl 0,1M pH=9. Puis on ajoute du KCl (80 mM), du lysozyme de blanc d'œuf (0,6 mg/ml) et du PMSF(1 mM). On laisse le mélange pendant 45 minutes dans la glace puis on fait 3 congélations et décongélations successives à l'azote liquide. Ensuite on centrifuge à 45 000 r.p.m 90 minutes. On récupère le surnageant contenant les extraits solubles.

### \* purification

#### -Précipitation des acides nucléiques à la streptomycine (2 % m/v)

On élimine les acides nucléiques par précipitation au sulfate de streptomycine 2 % préalablement neutralisée à pH = 7 avec une solution d'ammoniaque. On agite le mélange pendant 30 minutes à 4°C puis on centrifuge à 10 000 r.p.m, 30 minutes. On récupère le surnageant.

#### -Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium

## MATERIELS ET METHODES

---

On précipite une partie des protéines au sulfate d'ammonium à 65% de saturation (430 g/l). On ajoute le sulfate d'ammonium par petites quantités pendant 15 minutes. On agite pendant 45 minutes dans la glace, puis on centrifuge à 10 000 r.p.m, à 4°C pendant 30 minutes. Le culot est resuspendu dans 150 ml de tampon A (Tris-Cl 50 mM pH = 7,6 contenant 20% de glycérol et du PMSF 0,5 mM).

### -Chromatographie d'échange d'ions

Le mélange contenant la protéine est déposé sur une colonne PHarmacia X50/30 contenant 250 ml de cellulose échangeuse d'anions DE52, préalablement équilibrée avec un volume de tampon KPO<sub>4</sub> 1M, pH=7 contenant du PMSF 0,1mM et 4 volumes de tampon KPO<sub>4</sub> 0,15M, pH=7 contenant du PMSF 0,1mM. La protéine est éluée avec un gradient de phosphate de 0,15 à 0,3 M. Le débit d'élution est de 2ml/min. On recueille des fractions de 20 ml. Les protéines sont détectées par lecture de l'absorbance à 280 nm en spectroscopie UV-visible. La protéine R2 sort à environ 0,22 M en phosphate. Toutes les fractions contenant la protéine pure sont rassemblées.

### - Concentration de la protéine

On ajoute au volume ainsi recueilli 10% v/v de glycérol, puis on concentre la solution de protéine, d'abord par ultrafiltration sur membrane Diaflon YM30, sous pression d'azote, ensuite en utilisant un centricon 30 (Amicon, Inc, Bervely, MA 01915 USA), par centrifugation à 4500 r.p.m, à 4°C, jusqu'à obtenir un volume de 4 à 5 ml.

## III-2-Préparation de la protéine R1 d'*E. coli*.

La protéine R1 a été surproduite par clonage du gène *nrdA*, codant pour la protéine R1, après induction thermique des cellules C600, contenant le plasmide recombinant pLSH1 (Larsson et al., 1984).



## MATERIELS ET METHODES

---

Le culot de cellules est resuspendu dans du tampon Tris-Cl 0,1M, pH=9. La lyse des cellules et l'extraction des protéines s'opèrent de la même manière que pour R2. La précipitation des acides nucléiques s'effectue par le sulfate de streptomycine, à une concentration finale de 3%, et celle des protéines par le sulfate d'ammonium à 60%. Le culot de protéines est resuspendu dans du tampon Tris-Cl 25mM, pH=7.5, DTT 5mM, 10% de glycérol.

L'étape de chromatographie se fait sur une colonne échangeuse d'anions DE52 préalablement équilibrée avec du tampon KPO<sub>4</sub> 0.1M, pH=7, DTT 4mM. On applique un gradient de 0,1M à 0,33M en KPO<sub>4</sub>. Le débit d'élution est de 1,5 ml/min. On recueille des fractions de 15 ml.

On détermine la protéine R1 par un gel d'électrophorèse, en conditions dénaturantes (bande de migration à 83 kD). Toutes les fractions contenant la protéine pure, sont recueillies, et concentrées d'abord sur une membrane Diaflon YM30, en changeant trois fois le tampon avec du Tris-Cl 25mM, pH=7.5, DTT 5mM, 10% de glycérol, puis sur centricon 50.

### **III-3-Préparation de la protéine R2 de *M. tuberculosis*.**

Le plasmide pET11a, contenant le gène *nrdF2*, codant pour la protéine R2 de *M. tuberculosis*, nous a été offert par Harvey Rubin (Infectious disease section, Department of Medecine, University of Pennsylvania, Philadelphia).

La surexpression de la protéine R2 de *M. tuberculosis* a été réalisée avec la souche d'*E. coli* BL21(DE3), transformée avec le plasmide pET11a, contenant le gène *nrdF2*, codant pour la protéine R2-2 de *M. tuberculosis*. Les cellules recombinantes d'*E. coli* sont incubées à 37°C dans un milieu de culture LB, contenant de l'ampicilline (100µg/ml) et du sel de mohr (5µg/ml). Quatre heures après l'induction à l'IPTG (0,4mM) à une D.O = 0,4, la culture est arrêtée et centrifugée.

## MATERIELS ET METHODES

---

Le culot de cellules est resuspendu dans 30 ml de tampon Tris-Cl 50mM, pH=7, DTT 0,1mM, (tampon A), contenant 2mM de PMSF. Après la lyse des cellules par du KCl (80mM), et du lysosyme de blanc d'œuf (0,6mg/ml), les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 45000 r.p.m. On ajoute au surnageant une solution à 10% de sulfate de streptomycine, jusqu'à une concentration finale de 0,5% pour précipiter les acides nucléiques. Après élimination de ces derniers, on additionne au surnageant du sulfate d'ammonium à 60% de saturation. On centrifuge le mélange, et le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon A. La solution protéique est dialysée sur la nuit contre du tampon A pour enlever l'excès de sel. La solution de protéines est ensuite déposée sur une colonne échangeuse d'anions DE52 (1x 6cm) préalablement équilibrée avec du tampon A. La colonne est lavée avec 20ml de tampon A contenant 100 mM de KCl, puis par 15 ml de tampon A contenant 200 mM de KCl. La protéine MtbR2-2 est éluée avec 20 ml de tampon A, 300 mM de KCl. La solution protéique de MtbR2 est concentrée d'abord sur membrane Diaflon YM30, sous pression d'azote, en changeant trois fois le tampon par du tampon Tris-HCl 50mM, DTT 0,5mM, ensuite en utilisant un centricon 30, par centrifugation à 4500 r.p.m, à 4°C.

Une deuxième étape de chromatographie, une filtration sur une colonne Superdex 75 est alors réalisée. On élue les protéines avec du tampon Tris HCl 50 mM pH7,5 contenant 100 mM de KCl. On applique un débit de 0,4 ml/min et on récupère des fractions de 2 min. Les fractions contenant la protéine MtbR2 pure (le spectre UV-visible de ces fractions présente le pic d'absorption à 410 nm du radical tyrosinyle) sont rassemblées, et concentrées sur centricon 30 après addition de 10 % de glycérol.

### III-4-Préparation de la protéine R2 de *P. falciparum*.

Le plasmide pET, contenant le gène *nrdB* codant pour la protéine R2 de *P. falciparum* (PfR2), nous a été offert par Harvey Rubin (Infectious disease section, Department of Medecine, University of Pennsylvania, Philadelphia).

## MATERIELS ET METHODES

---

La protéine PfR2, a été exprimée par transformation des souches d'*E. coli* BL21(DE3) avec le plasmide pET, contenant le gène codant pour la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase de *P. falciparum*. Les souches d'*E. coli* BL21(DE3) recombinantes sont incubées à 37°C dans le milieu de culture LB, contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et du sel de mohr (5 µg/ml). Trois à quatre heures après induction à l'IPTG (0,4mM) à une D.O de 0,4, la culture est arrêtée et centrifugée.

Le protocole d'extraction et de purification est presque le même que celui de la protéine MtbR2, décrit précédemment :

- Précipitation des acides nucléiques par la streptomycine sulfate à une concentration finale de 2,5%.
- Précipitation d'une partie des protéines par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation.

L'étape de chromatographie se fait sur une colonne échangeuse d'anions DE52 (volume = 40 ml) préalablement équilibrée avec du tampon KPO<sub>4</sub> 10mM, KCl 30mM, PMSF 1 mM pH7. Après dépôt de la protéine sur la colonne, on fait passer 3 volumes (120 ml) du même tampon. Puis la protéine PfR2 est éluée avec 3 volumes de tampon KPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 70 mM, PMSF 1mM, par un débit de 0,5 ml/min. On recueille des fractions de 2 min. Toutes les fractions contenant la protéine pure sont concentrées sur membrane Diaflon YM30 puis en utilisant un centricon 30.

### **III-5- Préparation de la protéine M2 de souris.**

La protéine M2 recombinante de souris, nous a été offerte par le docteur Lepoivre (ERS CNRS 571, Université Paris Sud, Bât. 430, 91405 Orsay Cedex, France). Elle a été préparée comme cela a été décrit par Mann et al., 1991, à partir de la souche d'*E. coli*, BL21(DE3)-pETM2, contenant le gène

codant pour la protéine M2 de souris. Après purification, la protéine M2 est obtenue entièrement sous forme apoprotéine.

### III-6- Dosage des protéines.

Les concentrations des différentes protéines ont été déterminées par la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976 ) basé sur le changement de coloration à 595 nm du bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant sur les protéines. L'albumine de sérum de bœuf est utilisée comme standard.

La protéine R2 d'*E coli* a également été dosée en spectroscopie UV-visible à partir de l'absorbance à 280 nm avec un coefficient d'extinction molaire de  $\epsilon_{280-310} = 120\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (Sahlin et al., 1990).

### III-7- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire. L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes sur un gel à 15% en polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont coulés entre deux plaques de verres (10,1 cm x 8,3 cm), montées avec des espaceurs de 1 mm (appareil d'électrophorèse Bioblock E 455) selon la méthode de LAEMMLI (1970).

La migration est réalisée sous 150 V, 30 mA et pendant 90 min. Après migration le gel est coloré pendant une heure au bleu de coomassie, puis décoloré jusqu'à la disparition complète de la coloration entre les bandes protéiques. Il peut être placé dans une solution de conservateur ou séché directement entre deux feuilles de cellophane.

## MATERIELS ET METHODES

Tampon de migration 10x		Gel de séparation 15% acrylamide		Gel de concentration 5% acrylamide		Tampon de dénaturation	
Tris base	30g	Acryl. 30%	3 ml	Acryl. 30%	0,85 ml	Tris 1M pH 6,8	625µl
Glycine	144g	Bisacryl. 2%	0,9 ml	Bisacryl. 2%	0,35ml	SDS 10%	2 ml
SDS	10g	Tris-HCl 1M	1,78ml	Tris-HCl 1M	625µl	Glycérol	1,7 ml
H <sub>2</sub> O qsq	1l	pH 8,8		PH 6,8		Bleu de br 2%	0,1ml
		H <sub>2</sub> O	0,26ml	H <sub>2</sub> O	3,15 ml	β-mercatoEt.	0,2 ml
		SDS 10%	60µl	SDS 10%	50µl	H <sub>2</sub> O qsq	10 ml
		Temed	4µl	Temed	3-4µl		
		APS 10%	30µl	APS 10%	25-30µl		

Les marqueurs de masse moléculaire employés sont la phosphorylase b (94 kDa), le sérum albumine de boeuf (67kDa), l'ovalbumine (43kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur de la trypsine (20,1 kDa) et l'α-lactalbumine (14,4 kDa).

Colorant		Décolorant		Conservateur	
Bleu de coomassie	12,5 mg	Méthanol	1,5 l	Méthanol	100 ml
Méthanol	1,5 l	Ac. acétique	0,5 l	Glycérol	10 ml
Ac. acétique	0,5 l	Glycérol	0,25 l	H <sub>2</sub> O	890 ml
Glycérol	0,5 l	H <sub>2</sub> O	2,75 l		
H <sub>2</sub> O	1,75 l				

### III-8- Reconstitution des protéines R2.

Les protéines R2 sont purifiées entièrement ou en partie sous forme d'apoprotéine (la forme sans fer et sans radical). La méthode de reconstitution du radical tyrosinyle décrite par Atkin et al., 1973 a donc été utilisée. La reconstitution de la protéine active se fait par traitement de l'apoprotéine avec des ions FeII maintenus réduits par un réducteur tel que l'ascorbate ou en solution dans l'acide chlorhydrique ( $10^{-2}$ M). Le mélange fer ascorbate dans les proportions 1/10 est préparé sous argon avec du Tris-HCl 50 mM pH = 7,5. Le tampon dans lequel les sels ferreux et l'ascorbate sont dissouts, est désoxygéné préalablement par bullage d'argon pour éliminer les traces

d'oxygène, pendant 1 heure. On fait alors réagir une certaine quantité de cette solution ferreuse sur la protéine dégazée de façon à obtenir un excès d'au moins 4/1, par rapport à la quantité de fer présente dans la protéine active (seulement un excès de 2/1 dans le cas de la protéine M2 de souris).

Pour éliminer l'excès de fer, on fait passer le mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex G25 (Aldrich Chemical Company, Inc.) équilibrée avec du tampon Tris-Cl 50 mM pH = 7,5 20% de glycérol. La protéine R2 qui n'est pas retenue, est éluée en premier.

### III-9- Quantification du radical tyrosinyle dans les protéines.

La quantité de radical par protéine a été déterminée de 2 manières :

- Les spectres UV visibles des différentes protéines R2 sont tracés après purification et après reconstitution ; la quantité de radical par protéine est déterminée à partir de l'absorbance à 410 nm. Cette absorbance est soustraite de l'absorbance à 410 nm du spectre obtenu après disparition totale du radical tyrosinyle par réaction de la protéine avec l'hydroxyurée ajouté à une concentration de 4 mM ( $\Delta\epsilon_{410} = 3250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Ormö et al., 1995).
- Le spectre RPE des protéines avant et après reconstitution est tracé et l'intensité du signal centré à  $g=2$  du radical tyrosinyle est comparée à celle du signal de la protéine R2 sauvage d'*E.coli* radicalisée à 100% (i.e. 1,6 radical par protéine).

### III-10- Dosage du fer de la protéine R2.

Ce dosage, dérivé de la méthode de Fish (1985), est basé sur la réaction colorimétrique de la bathophénantroline disulfate lorsque celle-ci complexe le fer. Le dosage est effectué sur X  $\mu\text{l}$  de protéine, complété à 65  $\mu\text{l}$  avec de l'eau (cette quantité de protéine est représentative d'une certaine quantité de fer) :

## MATERIELS ET METHODES

---

45  $\mu$ l d'acide perchlorique (PCA) sont ajoutés à la solution protéique. On centrifuge 5 min à 15 000 r.p.m, après 15 min d'incubation à température ambiante. 90  $\mu$ l du surnageant sont prélevés et traités avec :

- 72  $\mu$ l de bathophénantroline disulfate (1,7 mg/ml)
- 36  $\mu$ l d'ascorbate de sodium (38 mg/ml)
- 27  $\mu$ l d'acétate d'ammonium saturé (1 mg/ml), dilué au tiers.

Chaque échantillon est vigoureusement mélangé, et une coloration rose apparaît aussitôt. on laisse incuber 20 min à température ambiante. Après avoir vortexé, on lit l'absorbance à 535 nm et 680 nm, ce qui permet de déterminer la quantité de fer présente dans la protéine.

Pour obtenir une gamme étalon, le même protocole est appliqué à une solution de sel de Morh : 3,92 mg dans 1 ml d'HCl 1N, dilué 20 fois dans l'eau. Alors 1  $\mu$ l de cette solution contient 0,5 nmole de fer.

### III-11- Test d'activité enzymatique.

L'activité de la protéine R2 et des mutants R2 d'*E. coli*, est mesurée à partir de leur pouvoir catalytique, pendant la réduction d'un ribonucléotide particulier, le CDP. On prépare un mélange réactionnel comprenant :

- L'ATP (2,6 mM), effecteur positif.
- La thiorédoxine (80  $\mu$ g/ml), réduite par du DTT (10 mM).
- Du MgCl<sub>2</sub> (12 mM), nécessaire à la liaison R1-R2.
- Le substrat, en partie marqué au tritium ; <sup>3</sup>H-CDP (0,3 mM, 41321 cpm/mol), CDP (2 mM).
- La sous-unité R1 (4-5 mg/ml).
- Du tampon Tris-Cl 40 mM, pH=8.

On ajoute à 50  $\mu$ l du mélange réactionnel, différentes quantités de protéines R2. On incube 10 min à 30°C, et on arrête la réaction en chauffant 1

## MATERIELS ET METHODES

---

à 2 min à 100°C. On centrifuge 5 min à 15000 r.p.m. Ensuite, on ajoute une unité de phosphatase alcaline dans chaque tube (50 µl d'une solution de 12 mg/ml), pour convertir les ribonucléosides diphosphates en monophosphates. On incube pendant une heure à 37°C, puis on fait une dénaturation à 100°C pendant 1 à 2 minutes. Après centrifugation à 15000 r.p.m, pendant 10 min, on récupère le surnageant que l'on dépose sur une colonne échangeuse d'anions AG1X8 (Bio-rad Φ 0,7cm x 5cm), préalablement lavée avec deux volumes d'eau. On élue le dCMP formé par 7ml d'eau. La quantité de <sup>3</sup>H-dCMP présente est déterminée par un compteur de scintillation LKB.

Une unité U d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme radicalisée qui catalyse la formation d'une nmole de dCDP. L'activité spécifique (AS), est exprimée en U par mg et par minute.

### III-12- Méthode de réduction du radical tyrosinyle.

Les expériences sont réalisées en aérobiose (sauf avec l'hydrazine et l'hydroxylamine) dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH = 7,5. La caractérisation de la réduction se fait en RPE. On introduit dans un tube RPE la solution protéique à une concentration donnée, dans un volume final de 200 µl. Le tube est congelé à l'azote liquide, et un spectre de référence est tracé. Le tube est ensuite décongelé, et on introduit de 2 à 5 µl de la solution de réducteur pour atteindre la concentration désirée. A partir de ce temps t = 0, des tracés de spectres sont effectués à des intervalles de temps réguliers, correspondant à des périodes d'incubation dans un bain-marie à 37°C. Le tube est congelé dans l'azote avant chaque tracé du spectre. La réduction du radical tyrosinyle est caractérisée par une diminution du signal caractéristique centré à g = 2,0047.

Certains agents réducteurs comme l'hydrazine et l'hydroxylamine réduisent le fer, en plus du radical tyrosinyle. Or nous avons vu précédemment que cette forme de protéine inactive obtenue, R2 réduit, pouvait en présence d'oxygène



## MATERIELS ET METHODES

---

donner la protéine active, empêchant ainsi d'observer la réduction réelle du radical tyrosinyle. Ce qui nous a conduit pour ces agents réducteurs à opérer en anaérobiose. Le tampon et la solution contenant le réducteur sont désoxygénés par bullage d'argon pendant 3 heures. La protéine, quant à elle, est désoxygénée en faisant passer un courant d'argon au-dessus de la solution protéique pendant 20 min. Un spectre de référence sur le tampon contenant le réducteur à la concentration appropriée est enregistré et soustrait automatiquement des spectres du mélange contenant la protéine R2. La réduction du radical tyrosinyle de R2 est caractérisée en spectroscopie UV visible par la disparition du pic d'absorption à 410 nm.

### **III-13- Culture des cellules végétales et mesure de la croissance cellulaire d'*A. thaliana*.**

Les échantillons de cellules de plantes sont déposés dans 24 puits d'une plaque stérile de culture cellulaire (Nunc) et on ajoute dans chaque culture indépendante 1,5 ml de milieu de culture. Le milieu de Murashige et Skoog (MS) (ref. Murashige et Skoog *physiol. Plant.* 15, 473 1962) a été modifié ; pour 1l de milieu : 4,3 g de poudre de macro et de microéléments (fournis par Duchefa, cat. N° MO221 Haarlem Netherlands), 10 ml de solution H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> (20g/l), 0,5 ml de kinetine (0,1g/l), 0,5 ml 2,4 D 0,2g/l, 1 ml de solution vitaminée x 1000 ( Duchefa M 0409) et du saccharose 30g/l.

Ces puits sont inoculés à une absorbance d'environ 0,06 de D.O avec une suspension cellulaire d'*A. thaliana*, en début de phase stationnaire. Les plaques sont fermées avec du « magic scotch » et sont agitées à 220 rpm à 25°C dans un incubateur New brunswick « innova » 4230 réfrigéré. La lumière est fournie pendant 18 h par jour par deux tubes à fluorescence sylvania de 15 W, permettant ainsi la pPhotosynthèse. Les mesures de densité cellulaire sont faites quotidiennement. Pour éviter la dispersion de lumière pendant la mesure d'absorbance, des images numérisées des cultures ont été prises en dessous grâce à un miroir.

## MATERIELS ET METHODES

---

Le système de caméra vidéo « Biorad Geldoc 1000 » a été utilisé, avec le logiciel “molecular analyst” pour la quantification. Pour enregistrer l’image des plaques, la hotte de la caméra est placée en position horizontale. Un miroir est introduit à travers la porte entrouverte de la hotte, avec un angle de 45° par rapport au plan de la lumière horizontale. Ce miroir est tenu par un support spécial, qui maintient également les cultures bien horizontales sur la plaque de glace, et permet à la source de lumière renversée du gel doc d’être à 10 cm au-dessus des cultures. Des photos sont prises dans des conditions de luminosité constante. Dans ces conditions, une relation de proportionnalité a été trouvée entre l’absorbance des puits au niveau du profil densimétrique des images prises et la quantité de cellules dans les puits. Les images des plaques de culture, sans cellules ont été utilisées comme référence pour la ligne de base, et ont montré une lumière d’intensité non négligeable. Cet effet a été compensé par la soustraction de la ligne de base, pour les autres calculs.

Les profils des mesures et de la ligne de base, ont été établies en utilisant un symbole rectangulaire, du logiciel “image analysis”.

### **IV- Techniques biophysiques.**

#### **IV-1- Spectroscopie d’absorption UV-visible.**

L’absorption d’un photon d’énergie  $h\nu$  approprié permet à une molécule ou à un atome de passer d’un état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_1$ . En solution, seules les transitions électroniques de faible énergie sont observables, c’est à dire les bandes d’absorption dans l’ultraviolet proche et dans le visible. Chaque bande d’absorption est caractérisée par une longueur d’onde du maximum d’absorption,  $\lambda_{max}$ , et par son intensité, donné par la valeur du coefficient d’extinction molaire ( $\epsilon$ ) à la longueur d’onde considérée. Ces deux grandeurs sont reliées, par une relation simple, à la concentration du soluté en solution par la loi de Beer-Lambert :  $A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.[C]$  où  $A$  est l’absorption,  $\epsilon$

le coefficient d'extinction molaire,  $l$  la longueur du trajet optique et  $[C]$  la concentration.

Les spectres d'absorption UV-visible sont obtenus à partir d'un spectromètre UVICON 930.

### IV-2- Résonance paramagnétique électronique (RPE).

Lorsqu'une particule (ici un électron) qui possède un moment magnétique est placée dans un champ magnétique, le moment magnétique s'oriente dans différentes directions correspondant à différents états d'énergie. Les transitions entre ces états sont induites par l'absorption d'ondes électromagnétiques de fréquences appropriées, pour l'électron dans la région des micro-ondes : c'est le phénomène de résonance paramagnétique électronique (RPE). La RPE est donc une technique essentielle pour l'observation des entités moléculaires contenant des électrons non appariés ou plus généralement un moment de spin, c'est à dire des formes radicalaires, ou des centres contenant des métaux de transition tels que le fer, le nickel, le cobalt, et le cuivre. Un électron non apparié possède un moment magnétique défini par la relation  $\mu = g_e \beta_e S$  où  $g_e$  est la constante pour un électron libre ( $g_e = 2,0023$ ),  $\beta_e$  le magnéton de Bohr ( $\beta = eh/4\pi m$ ) et  $S$  le spin de l'électron. L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire ou atomique possède un **facteur g** différent de  $g_e$ , la différence entre les deux résultant du couplage entre les moments de spin et d'orbite. Le couplage est anisotrope c'est à dire que le facteur  $g$  est assimilable à une grandeur tensorielle composée de trois valeurs propres  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$ . En solution gelée, conditions d'études pour les protéines, les sites paramagnétiques n'ont pas d'orientation préférentielle ; le spectre RPE est la somme des spectres de tous les sites au même moment. Le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption. Les transitions observées sur le spectre correspondent aux points d'inflexion et à l'extrémum du spectre d'absorption ( $g_x, g_y$  et  $g_z$ ).

Les spectres RPE à 100K à bas champ ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ESP 300E au LEDSS (Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, Université Joseph Fourier, CNRS UMR 5616, Chimie-recherche, Grenoble, France). Les spectres RPE à haut champ (286 GHz) ont été tracés à 4K en utilisant un spectromètre à haut champ du laboratoire de haut champ magnétique de Grenoble (High Magnetic Field Laboratory, MPIF-CNRS, B.P. 166, F-38042 Grenoble Cedex France).

### IV-3- Dichroïsme circulaire.

La spectroscopie CD est un des aspects de l'activité optique, qui se manifeste par la différence entre l'absorbance d'un échantillon pour de la lumière polarisée circulairement successivement droite et gauche. Elle obéit à la loi de Beer-Lambert :

$$\Delta A = A_G - A_D \quad \text{et} \quad \Delta \epsilon = \Delta A / lC = \epsilon_G - \epsilon_D$$

$\Delta \epsilon$ , le pouvoir dichroïque molaire, représente la différence entre les deux coefficients d'extinction de chaque lumière correspondante.  $C$  est la concentration du chromophore et  $l$  (0,1 cm) le trajet optique.

Dans les protéines, ce ne sont pas les acides aminés qui jouent le rôle important dans le dichroïsme, mais plutôt les conformations de type hélicoïdal que peuvent prendre les chaînes polypeptidiques. Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ , ont tous deux un dichroïsme négatif vers 220nm, avec une légère différence de spectre entre les deux. Par contre, les régions de protéine non ordonnées en hélice ou en feuillet, dites en pelote statistique, présentent un dichroïsme plus faible et de sens opposé. Ainsi, le spectre de CD des bandes absorption de la liaison peptidique vers 200-230 nm va être, pour une protéine donnée, un reflet des structures secondaires qu'elle contient. La comparaison des spectres CD de protéines modifiées par mutagenèse dirigée et de la protéine sauvage permet de mettre en évidence des perturbations importantes de structure dues à la mutation. L'intensité du dichroïsme est exprimée en ellipticité molaire spécifique ( $\theta$ ), deg.cm<sup>2</sup>/dmol. ( $\theta$ ) est proportionnelle à la différence entre les coefficients d'extinction molaire,  $\Delta \epsilon$ .

## MATERIELS ET METHODES

---

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à l'aide d'un spectropolarimètre Jobin Yvon CD6 mis à notre disposition par le Dr. Claude Pfister de l'Institut de Biologie Structurale. Les cuvettes utilisées ont un trajet optique de 0,1 cm et les spectres ont été enregistrés à 20°C.

# **RESULTATS**



**PARTIE A :**  
**ETUDE PAR MUTAGENÈSE DIRIGÉE DE**  
**L'EXISTENCE D'UN CANAL D'ACCÈS AU**  
**RADICAL TYROSINYLE DE LA RDPR D'*E. coli*.**



## PARTIE A

---

**INTRODUCTION**

## PARTIE A

---

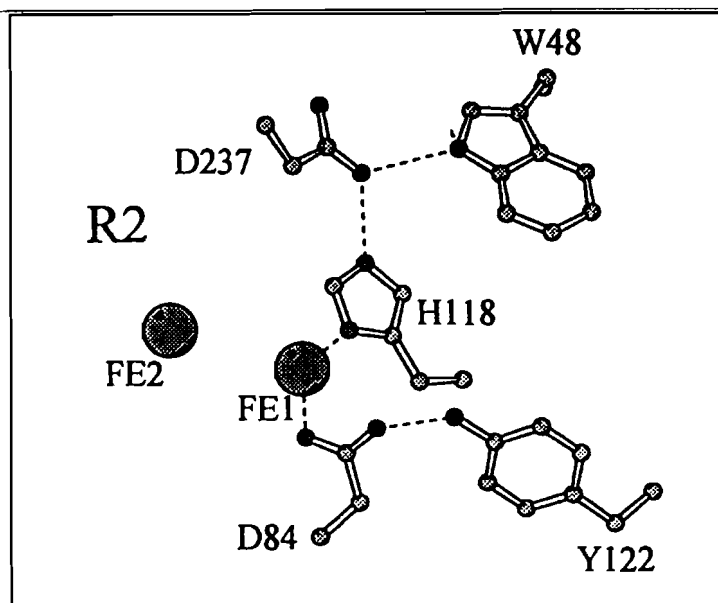
### **I-Réactivité du radical tyrosinyle : transfert d'électrons direct ou à longue distance ?**

La détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine R2, a permis d'obtenir de nombreuses informations sur la topologie du site radicalaire (Nordlund et al., 1990) :

□ Cette structure a montré que le radical tyrosinyle était situé dans une poche hydrophobe, laquelle contribue à sa stabilité (Örmo et al., 1995). La mutation d'un des trois résidus hydrophobes conservés (Phe 208, Phe 212, Ile 234) présents dans cette poche, entraîne une perte de la stabilité du radical tyrosinyle (Örmo et al., 1995).

□ Le radical tyrosinyle est enfoui dans la matrice protéique, à au moins 10 Å de la surface la plus proche. Il était suggéré que les piègeurs de radicaux ou les agents réducteurs ne pouvaient pas accéder au site radicalaire, mais réagissaient avec ce dernier par un transfert d'électrons à longue distance à partir de la surface protéique.

En se basant sur des données structurales de la protéine R2 d'*E. coli*, Nordlund et al. 1990 ont proposé une chaîne de transfert d'électrons entre la Tyr 122, et le Trp 48 situé à la surface protéique (figure A-1). Cette chaîne comprend, le Trp 48, Asp 237, His 118, l'atome de Fe1, Asp 84 et la Tyr 122.



**Figure A-1** : Chaîne de transfert d'électrons dans la RNR de classe I d'*E. coli* proposée par Nordlund 1990.

En effet, l'énergie d'activation de 67 kJ/mol (Karlsson et al., 1991), calculée à partir de la représentation d'Arrhénius (la fonction d'Arrhénius, se traduit graphiquement par une droite si on porte la vitesse réactionnelle en coordonnées semi-logarithmiques en fonction de l'inverse de la température), pour l'inactivation de la protéine R2 par l'hydroxyurée, n'est pas en contradiction avec un mécanisme de transfert d'électron. Dans les autres systèmes, des énergies d'activation de 20-30 kJ/mol ont été trouvées pour des processus de transfert d'électrons impliquant jusqu'à trois résidus acides aminés (Gray et al., 1989 ; Bobrowski et al., 1990 ; Nathan et al., 1990 ; Thieren et al., 1990).

Dans une réaction, l'état initial est séparé de l'état final par une colline énergétique, dont le sommet correspond à l'état de transition, non isolable. Moins cette barrière est haute et plus la réaction est rapide. Pour cette réaction, on définit des paramètres  $\Delta G^*$  (la variation d'énergie libre),  $\Delta H^*$  (l'enthalpie d'activation) et  $\Delta S^*$  (la variation d'entropie d'activation). La pente de la droite du graphique d'Arrhénius est égale à  $-E / 2,3 R$  où la grandeur  $E$ , est appelée énergie d'activation de la réaction. La détermination de ces paramètres donne parfois des indications intéressantes sur le mécanisme chimique de la réaction au niveau de la protéine. Des variations d'entropie dans un sens ou dans l'autre sont

## PARTIE A

souvent liées à des changements dans l'état d'hydratation de la protéine notamment quand l'entrée du substrat dans le site actif déplace des molécules d'eau.

□ Si la nature enfouie du radical tyrosinyle semble aller dans le sens d'un transfert d'électrons à longue distance, il a également été suggéré que les piègeurs de radicaux pouvaient pénétrer à l'intérieur de la structure protéique par un chemin d'accès et transférer directement leurs électrons de façon directe (Kjøller-Larsen et al., 1982). Des études de réduction des centres redox de R2 par une famille d'hydrazines et d'hydroxylamines monosubstituées ont en effet mis en évidence des critères gouvernant la réactivité de ce radical. En particulier, il a été souligné que le fait d'augmenter l'encombrement stérique des agents réducteurs testés diminuait l'efficacité du transfert d'électrons aussi bien vers le centre ferrique que vers le radical tyrosinyle. Par ailleurs le radical tyrosinyle est apparu particulièrement sensible à la présence de groupements hydrophobes sur les molécules étudiées et plus précisément celle de groupements phényles ou benzyles. Par exemple, il a été montré que la phénylhydrazine était beaucoup plus réactive vis à vis du radical que la méthylhydrazine elle-même plus réactive que l'hydrazine non substituée (Gerez et al., 1992). Des observations analogues ont été faites par Atta et al., 1993, lors d'études comparatives de la réactivité des radicaux tyrosinyles de la protéine R2 d'*E. coli* et de l'Herpès vis à vis d'une série de phénols et d'acides hydroxamiques.

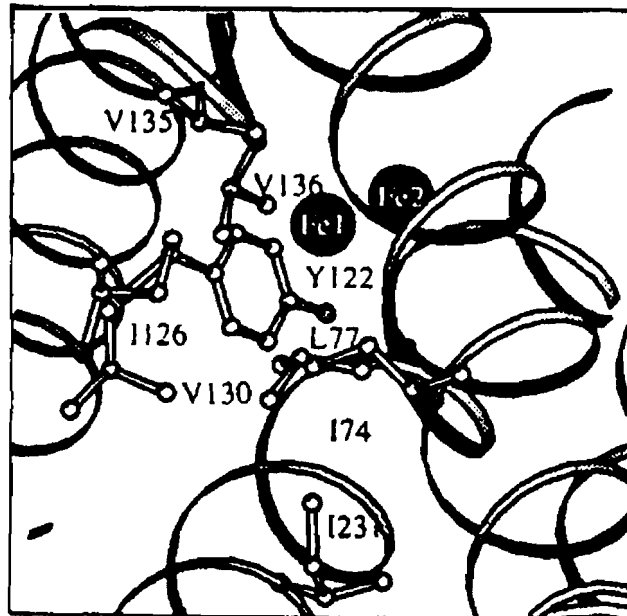
Une autre étude plus antérieure (Kjøller-Larsen et al., 1982) sur la protéine R2 isolée a montré que des acides hydroxamiques de dimensions trop importantes (supérieures à 4 x 6 Å) ne pouvaient pas réduire le radical tyrosinyle de la protéine R2 d'*E. coli*. Il a également été observé que les molécules chargées négativement n'avaient pas accès au radical de la protéine R2 (Lam et al., 1990 ; Gerez et Fontecave, 1992). Tous ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une voie de diffusion spécifique des piègeurs de radicaux à travers la protéine, laquelle ne permet pas la diffusion de molécules trop larges et/ou chargées négativement.

## PARTIE A

La question du mécanisme de réduction de tous ces agents chimiques se pose donc : y-a-t-il réduction de façon "directe" donc pénétration des molécules réductrices dans la structure pour accéder au radical tyrosinyle ou y-a-t-il un transfert électronique "indirect" depuis la surface de R2 à travers une chaîne d'acides aminés appropriés ?

A partir de ses études sur la taille et la modélisation de différents inhibiteurs, Kjølner-Larsen et al., 1982, avait proposé que le radical pouvait être accessible à travers une cavité de 6 Å de profondeur et de 4 Å de diamètre. Il y a cependant de larges composés qui ont la capacité de réduire le radical, i.e. la flavine (Fontecave et al., 1989) et la phénosafranine (Sahlin et al., 1989).

Jusqu'à présent, la structure tridimensionnelle de R2 n'avait pas révélé de route d'accès évidente depuis la surface de la protéine jusqu'au site enfoui des centres redox. Or en observant en détail cette structure, on a pu remarquer la présence d'une sorte de canal d'accessibilité au radical tyrosinyle composé en grande partie d'acides aminés hydrophobes tels que Ile, Leu, Val... Sa structure tridimensionnelle est illustrée figure A-2.



**Figure A-2:** Vu du radical tyrosinyle en arrière plan, et de certains acides aminés composant le canal hydrophobe de la protéine R2 sauvage d'*E. coli*.

Nous avons souligné précédemment que le radical tyrosinyle était particulièrement sensible à la présence de groupements hydrophobes sur les molécules réductrices . La présence de ce canal hydrophobe dans la structure est de ce fait très intéressante ; elle pourrait en effet expliquer cette réactivité particulière du radical tyrosinyle.

Pour vérifier si ce canal pouvait être un chemin d'accès emprunté par les molécules chimiques ciblées sur le radical tyrosinyle, nous avons envisagé de le modifier en mutant certains acides aminés de ce canal, de façon à le rendre soit plus ou moins hydrophobe, soit plus ou moins encombré, afin d'étudier l'effet que cela pourrait entraîner sur la réactivité du radical tyrosinyle.

Ce thème sera largement débattu dans la première partie de ce travail grâce à la mutagenèse dirigée, en comparant les cinétiques de réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 mutantes d'*E. coli* avec le type sauvage.

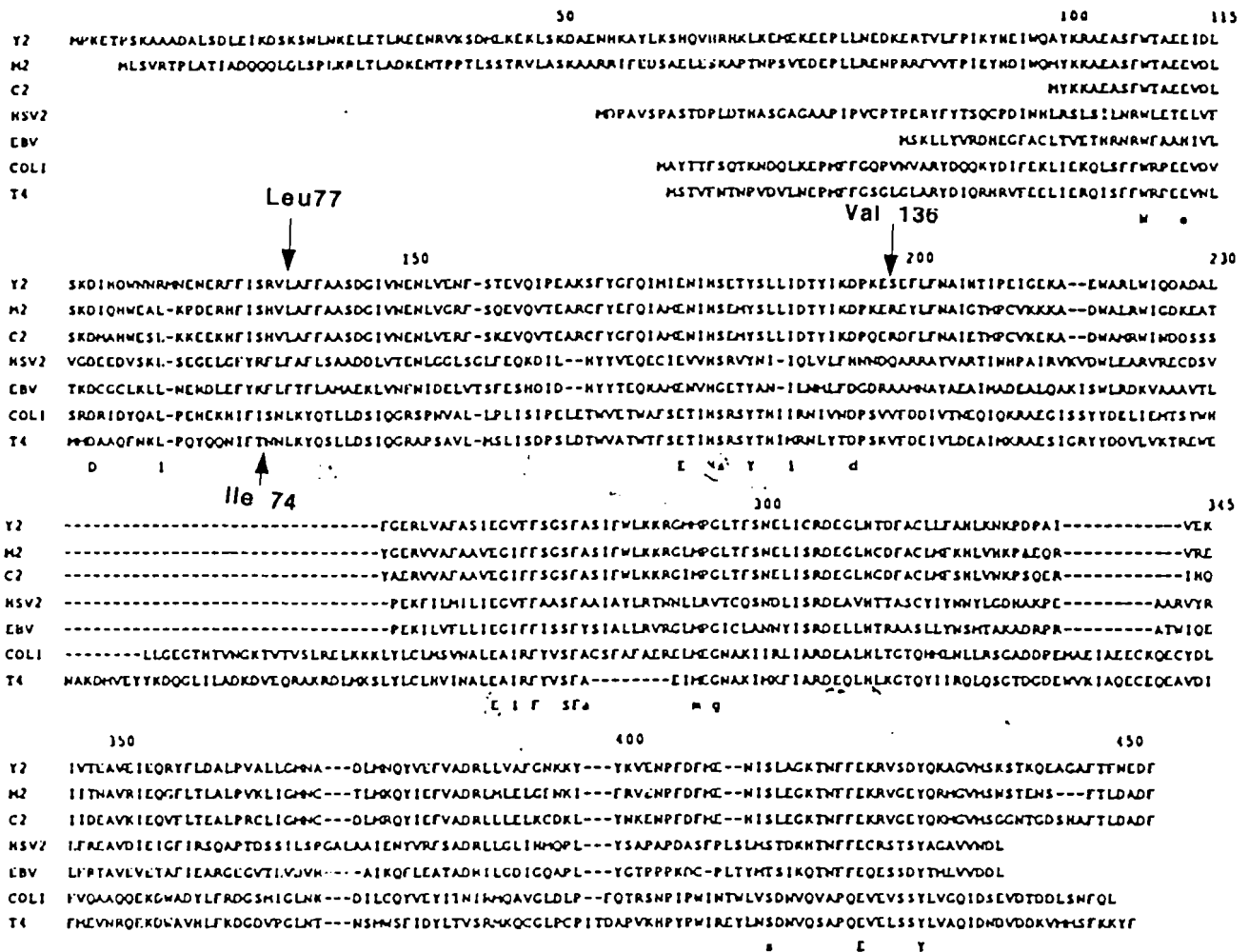
### **II-Choix des mutations.**

Etant en possession de la structure tridimensionnelle de la protéine R2, nous avons étudié par modélisation moléculaire les acides aminés constituant le canal afin de choisir ceux les plus appropriés pour notre étude. Notre choix s'est porté sur trois acides aminés, se trouvant à différents niveaux du canal : La leucine 77 proche du radical à environ 5 Å, l'isoleucine 74 et la valine 136, respectivement en position médiane et au sommet du canal.

La comparaison des séquences (figure A-3) montre que seule la leucine 77 est conservée chez *S. cerevisiae*, la souris et la palourde. Cette leucine 77 est remplacée par une phénylalanine dans les RNRs de virus.



# PARTIE A



**Figure A-3 :** Alignement des séquences acides aminés des protéines R2 d’*E. coli*, et R2 de l’Herpès (HSV2) de *S. cerevisiae* (Y2), de souris (M2), de palourde (C2), du virus d’Epstein-Barr (EBV) et du bactériophage T4 (T4).

Les mutations ont été choisies suivant trois caractéristiques, à savoir la taille, le caractère hydrophobe, et la charge des acides aminés :

- (i) Le remplacement de la leucine 77 en phénylalanine introduit dans le canal un résidu aromatique de grande taille, avec un renforcement du caractère hydrophobe.
- (ii) Au niveau de la position 74, les mutations réalisées substituent à l’isoleucine une série de résidus apportant des modifications particulières d’un mutant à l’autre. Tout d’abord, le passage d’une isoleucine à une lysine ou à une arginine introduit un résidu chargé positivement à son extrémité et dont la taille est significativement augmentée. L’isoleucine

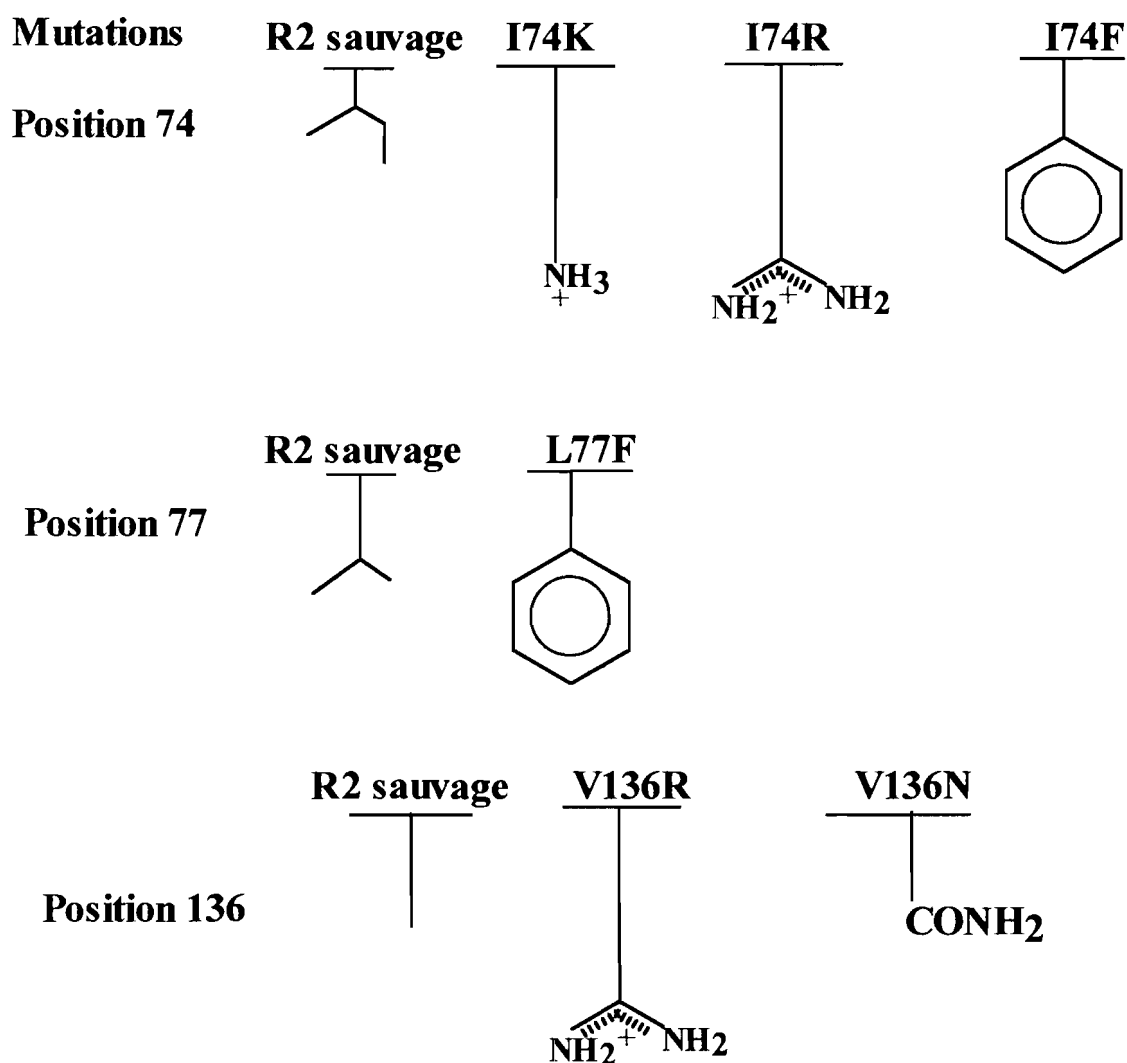
## PARTIE A

74 sera ensuite mutée en phénylalanine, résidu aromatique de grande taille.

- (iii) La valine 136 sera mutée en arginine ou en asparagine, deux acides aminés de grande taille et respectivement chargé et non chargé.

Toutes ces modifications sont illustrées dans la figure A-4.

Avec l'encombrement stérique du canal par des résidus de grande taille, on espère limiter le passage des molécules chimiques (dans l'hypothèse d'une réduction directe), et observer ainsi une baisse de la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis de ces agents réducteurs.



**Figure A-4** : Substitution réalisée au niveau de la leucine 77, l'isoleucine 74 et la valine 136 par mutagenèse dirigée.

## PARTIE A

---

**RESULTATS**

## PARTIE A

---

**Chapitre I : Construction, purification et  
caractérisation des protéines  
R2 mutantes.**

## PARTIE A

---

### I- Construction des protéines mutantes.

Nous avons réalisé pour chaque modification :

- Une mutagenèse selon la méthode de Kunkel (I74K, I74R) ou par PCR (L77F, I74F, V136R et V136N).
- Une identification des mutants par le séquençage
- Le sous-clonage des gènes mutés dans le vecteur de surexpression pJF119EH.

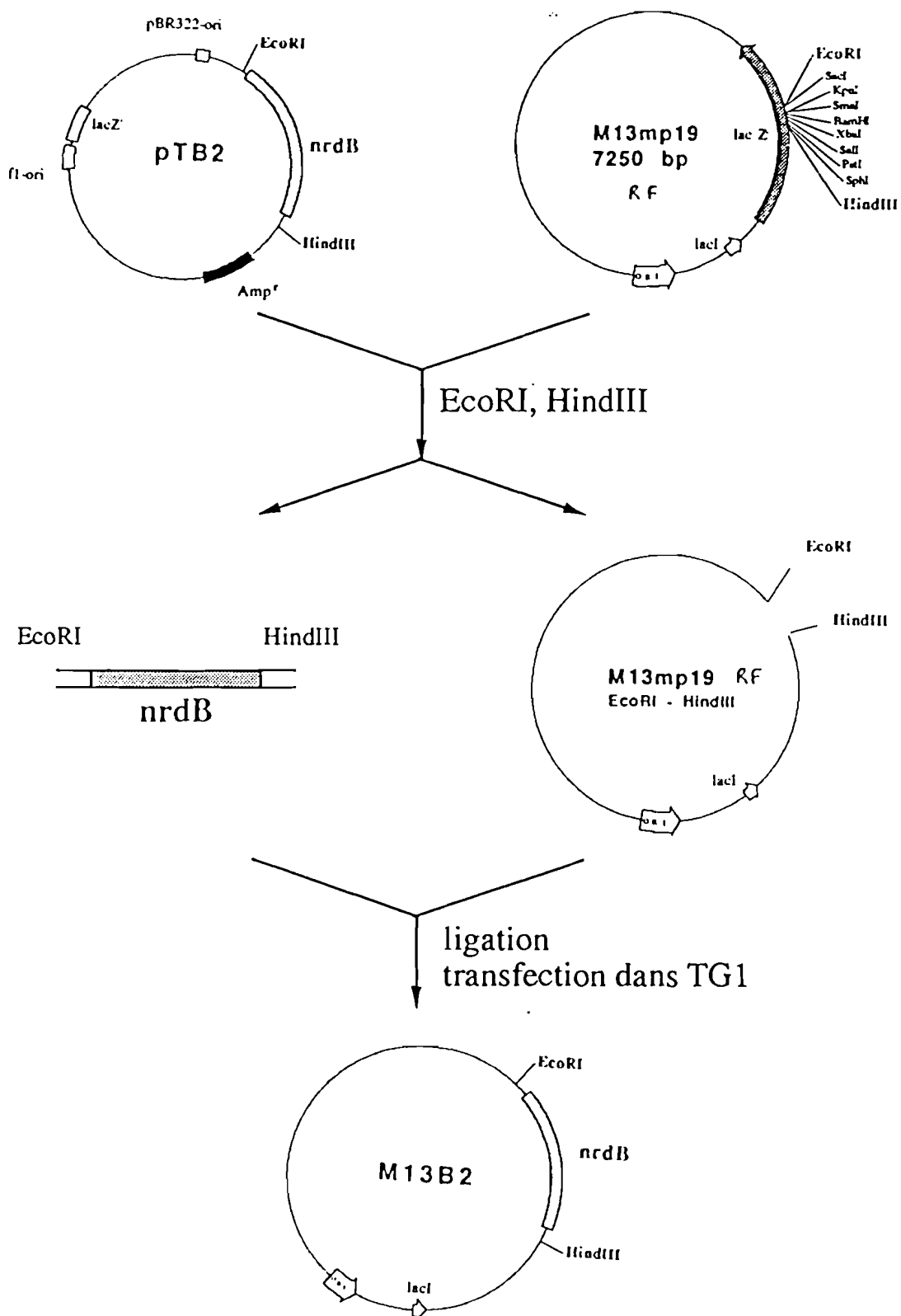
Puis les vecteurs pJF119EH, portant les gènes mutés, sont introduits dans les souches compétentes d'*E. coli* K12 pour la surexpression des mutants qui est sous le contrôle du promoteur *tac* inductible à l'IPTG.

Pour construire les mutants I74K et I74R nous avons utilisé le protocole décrit par Kunkel (Kunkel et al., 1987) qui nécessite la manipulation du bactériophage M13. Le sous-clonage de *nrdB* dans M13 est résumé dans la figure (A-I-1) : le gène *nrdB* issu de la digestion du plasmide pTB2 par EcoRI et Hind III est inséré dans le site de polyclonage du phage M13 double brin. Le phage M13B2 recombinant obtenu est utilisé sous sa forme simple brin pour la mutagenèse dirigée selon le protocole décrit dans la partie Matériels et méthodes (paragraphe II-5). L'ensemble des constructions réalisées a fait l'objet de vérification par l'analyse de leur profil de restriction sur gel d'agarose. Les mutations ont été vérifiées par séquençage. Dans chaque cas, nous avons séquencé le gène dans son intégralité afin de vérifier que la mutagenèse était spécifique à la position ciblée.

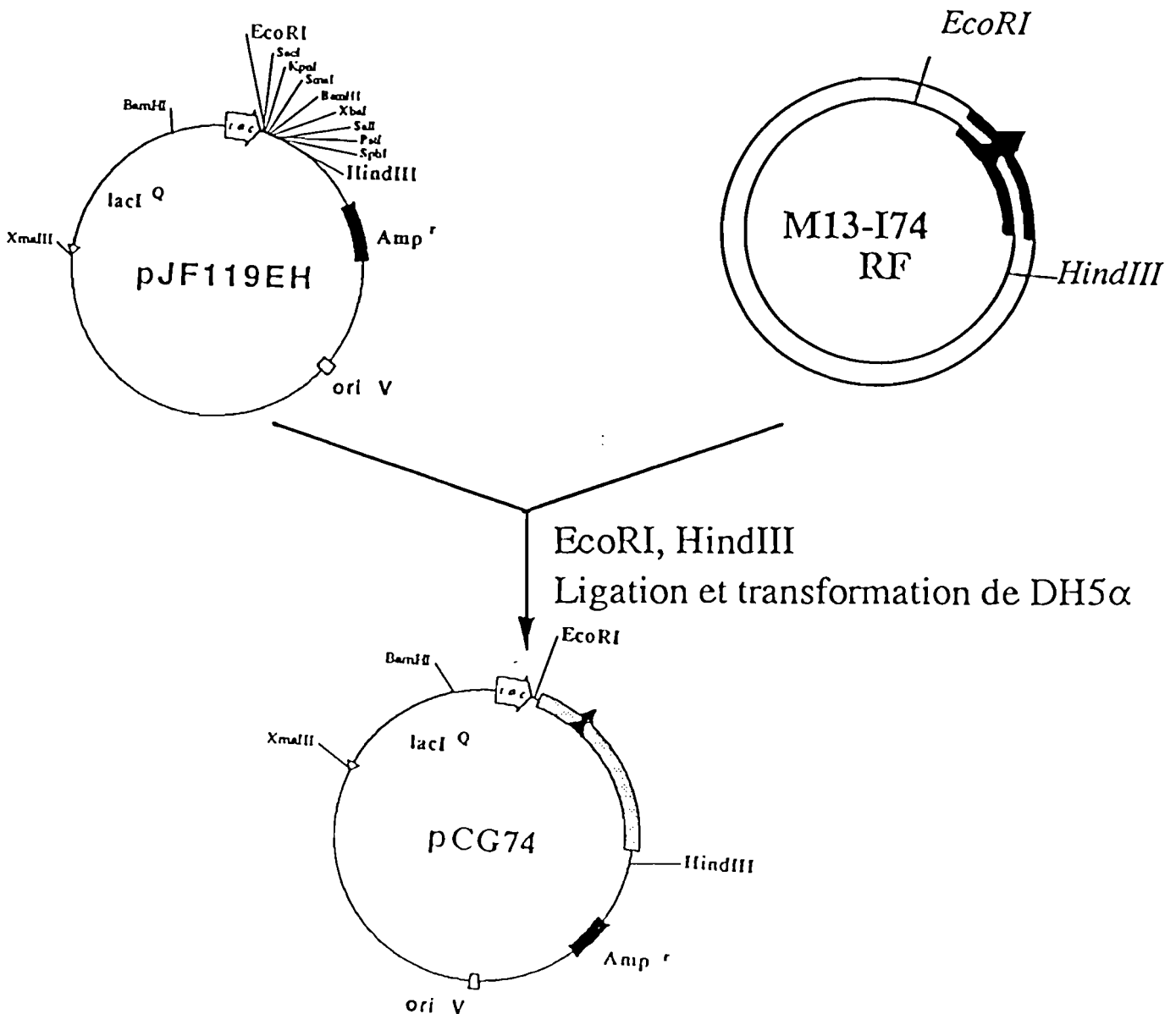
Ensuite, le gène muté est de nouveau sous-cloné du M13B2 portant la mutation correspondante vers le vecteur de surexpression pJF119EH précédemment décrit (cf. Matériels et Méthodes paragraphe I-1) (figure A-I-2). Le sous-clonage conduit à de nouveaux vecteurs nommés pCG74a (I74R), et pCG74b (I74K).



# PARTIE A



**Figure A-I-1** : Sous-clonage du gène *nrdB* dans le phage M13.

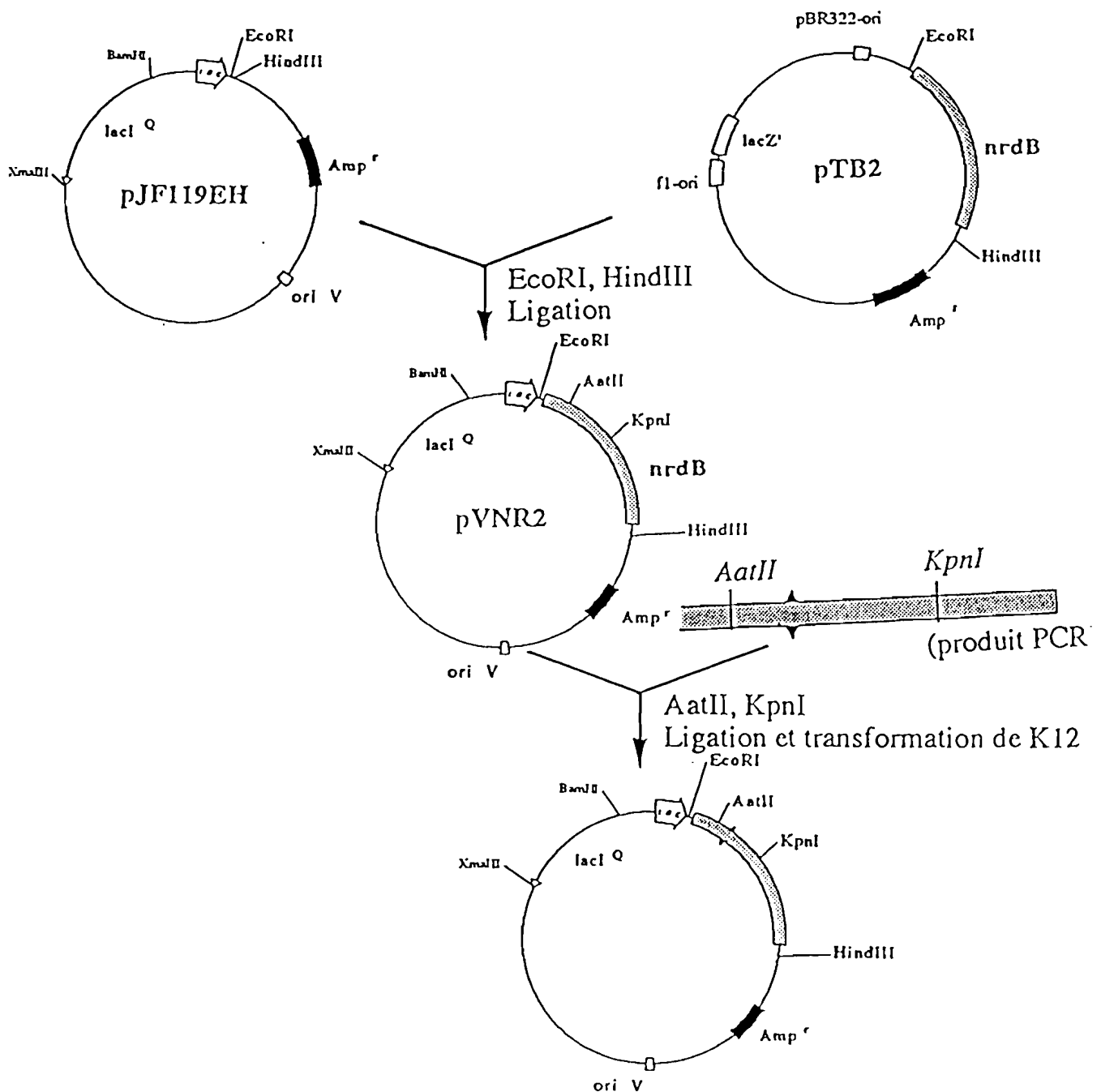


**Figure A-I-2** : Construction des vecteurs de surexpression pCG74a et pCG74b.

Pour construire les mutants L77F, I74F, V136R et V136N nous avons utilisé la méthode PCR décrite par Ho et al., 1989 (cf. Matériels et Méthodes paragraphe II-9-3). Le produit PCR contenant la mutation est purifié et digéré par les enzymes de restriction Aat II et Kpn I pour donner un insert de 357 pb. Le vecteur pVNR2 issu du vecteur pJF119EH et contenant le gène *nrdB* (figure A-I-3) est alors lui même digéré par les mêmes enzymes de restriction. Après purification de l'insert et du vecteur digéré (cf. Matériels et Méthodes paragraphe II-9-3), ceux-ci sont combinés par ligation avec la ligase du phage T4 pour donner les vecteurs de surexpression contenant les mutations désirées

## PARTIE A

nommés pCG77a (L77F), pCG74c (I74F), pCG136a (V136R) et pCG136b (V136N). Les mutations ont été vérifiées par séquençage du gène entier muté.

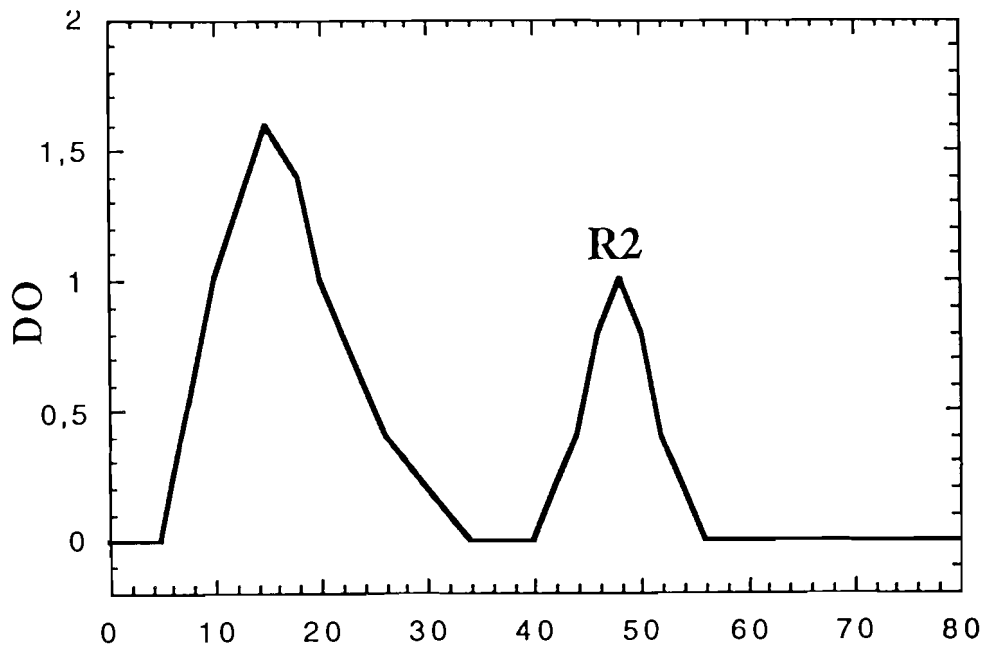


**Figure A-I-3 :** Construction des vecteurs de surexpression pCG74c, pCG77a, pCG136a, et pCG136b.

## II- Surexpression et purification des protéines.

La souche *E. coli* K12 est transformée avec les plasmides pCG74a, pCG74b, pCG74c, pCG77a, pCG136a et pCG136b et mise en culture en milieu LB, en présence d'IPTG. La surexpression de la protéine R2 sauvage est réalisée avec la souche *E. coli* K12 transformée avec le plasmide pVNR2. Un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes des extraits solubles de protéines après culture montre une bonne surproduction de la protéine R2 sauvage et des mutants (forte intensité de la bande à 43 kDa) qui représente environ 30 % des protéines totales (figure A-I-5).

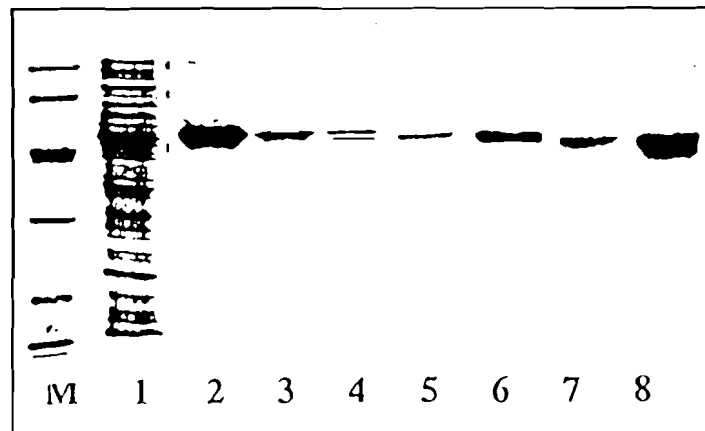
La purification de la protéine R2 et des mutants est opérée de la même manière (cf. Matériels et Méthodes paragraphe III-1). Elle ne nécessite qu'une seule étape de chromatographie sur une colonne échangeuse d'anions DE52. Toutes les protéines mutantes se comportent de la même manière que R2 sauvage, durant la purification, et ont un profil d'élution identique sur la colonne échangeuse d'anions DE52 en utilisant un gradient de concentration du tampon  $\text{KPO}_4$  allant de 0,15 à 0,3M (figure A-I-4).



**Figure A-I-4** : Purification des protéines R2 : colonne échangeuse d'anions DE52. L'élution des protéines par un gradient de  $\text{KPO}_4$  de 0,15 M à 0,3 M est suivie à 280 nm.

## PARTIE A

Les fractions contenant les protéines R2 sont identifiées soit par spectroscopie UV-visible (grâce au pic à 410 nm, caractéristique du radical tyrosinyle lorsque la protéine est active), soit sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (bande de migration à 43 kDa). Ces fractions sont rassemblées et concentrées jusqu'à environ 2 ml par ultrafiltration et centricon 30. Sur un gel d'électrophorèse, en conditions dénaturantes, elles migrent en une seule bande (située à environ 43 kDa), avec la même mobilité que R2 sauvage. L'ensemble des protéines purifiées possède un degré de pureté d'environ 90 % (estimé d'après le gel SDS-PAGE) (figure A-I-5).



**Figure A-I-5** : Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, (1) extraits solubles de R2 sauvage ; après étape sur une colonne DE52 et concentration par ultrafiltration des protéines (2) R2 sauvage, (3) L77F, (4) I74K, (5) I74R, (6) I74F, (7) V136R et (8) V136N.

Ce protocole de purification permet d'obtenir des protéines R2 mutantes avec un bon degré de pureté, et un rendement de purification d'environ 10 à 15 %, identique à celui de la protéine R2 sauvage.

### III- Caractérisation des protéines mutantes.

Les différentes protéines mutantes R2 : V136R, V136N, L77F, I74K, I74R et I74F ont été caractérisées selon plusieurs critères :

- (i) Leurs teneurs en fer et en radical.
- (ii) Leur capacité à former le radical tyrosinyle et à le stabiliser.
- (iii) La structure et la saturation du signal RPE de leur radical
- (iv) Et leur activité enzymatique lors de la réduction d'un ribonucléotide particulier le CDP.

## PARTIE A

Dans le tableau A-1, ci-dessous, sont représentées les principales caractéristiques des protéines R2 mutantes. Ces résultats comparés à ceux de R2 sauvage seront discutés en détail dans les paragraphes suivants.

Protéines	Quantité relative de fer (a)		Radical / R2 (c)		Demi-vie du radical (d)	Activité spécifique (e)
	avant rec.	après rec.(b)	avant rec.	après rec.		
R2	1	-	1	-	jours	5350
V136R	0	0,5	0	0,3	20 min	n.d.
V136N	0	1	0	0,9	10 min	n.d.
L77F	0,8	1	0,6	0,8	jours	3200
I74K	0,2	0,8	0,17	0,65	8 heures	5200
I74R	0,2	0,5	0,2	0,5	1 jour	2600
I74F	0,2	0,8	0,2	0,7	jours	2500

**Tableau A-1** : Caractéristiques des protéines R2 mutantes comparées à celles de la protéine R2 sauvage.

- (a) La teneur en fer est déterminée à partir de l'absorbance à 370 nm ( $\epsilon_{370} = 8700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).
- (b) Les protéines ont été reconstituées durant l'incubation avec des ions ferreux en présence d'oxygène, suivi d'un déssalage sur une colonne "Sephadex G25" (cf. matériels et méthodes § III-8).
- (c) La teneur en radical est déterminée par spectroscopie UV-visible par soustraction du spectre de la forme metR2, de celui de la protéine R2 active et en utilisant un coefficient d'extinction molaire à 410 nm de  $3250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .
- (d) Déterminée en UV-visible par la baisse du pic à 410 nm, à 25°C en fonction du temps.
- (e) En  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Les valeurs d'activité ont été corrigées en tenant compte du contenu en radical des protéines R2.

### III-1- Effets des mutations sur les centres redox de R2.

#### 1-Teneurs en fer et en radical des protéines R2 mutantes.

Les protéines mutantes R2 sont purifiées avec différentes teneurs en fer. Le mutant L77F présente, après purification, une quantité en fer normale, proche de R2 sauvage. Par contre, les mutations en position 74 entraînent de larges effets sur le centre ferrique, avec seulement 20% de sites métalliques occupés. Les mutants V136R et V136N, sont quant à eux, obtenus essentiellement sous

## PARTIE A

fome apoprotéine. Les quantités relatives de radical obtenues sont comparables aux quantités relatives de fer, ce qui montre que les protéines mutantes sont purifiées dans leur forme active ou dans leur forme apoprotéine, mais pas dans leur forme inactive metR2. En effet, dans ce dernier cas on obtiendrait une teneur en fer plus importante. Etant donné la présence d'apoprotéine dans les préparations, nous avons étudié la capacité de ces mutants à reconstituer les centres ferriques et les radicaux tyrosinyles manquants à l'aide d'ions ferreux et en présence d'oxygène (cf. Matériels et Méthodes paragraphe III-8).

Après reconstitution, les mutants L77F, I74F et I74K ont des teneurs en fer et en radical légèrement inférieures à celles de R2 sauvage mais très comparables. Le mutant I74R est plus difficile à reconstituer puisque seulement la moitié de ses centres métalliques est formée. Pour ces quatre mutants, le radical tyrosinyle présente une bonne stabilité bien que pour les mutants I74K et I74R les temps de demi-vie du radical soient significativement diminués (cf. tableau A-1).

Les mutations sur la valine 136 quant à elles affectent drastiquement la stabilité du radical tyrosinyle avec des temps de demi-vie respectifs pour les mutants V136R et V136N de 20 min et 10 min. Cette instabilité du radical de ces mutants ne nous a pas permis d'étudier leur réactivité.

### **2- Caractéristiques spectroscopiques.**

#### **a) Spectre UV-visible des mutants.**

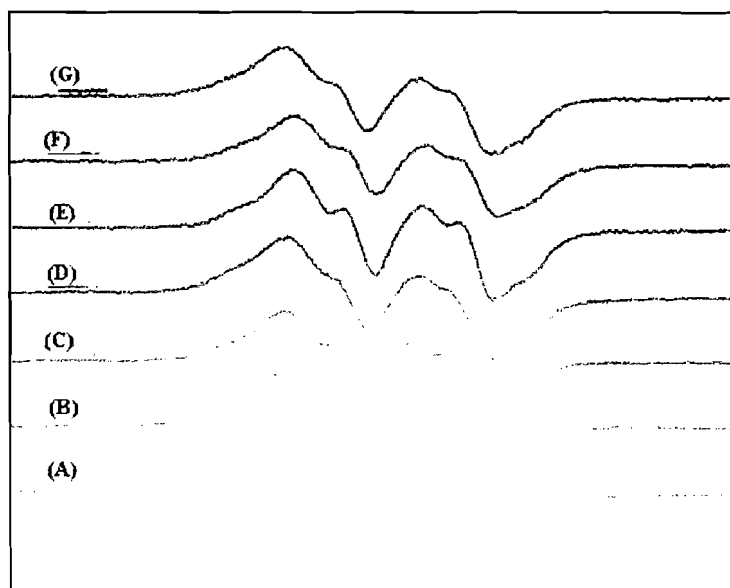
Les spectres UV-visible des protéines mutantes reconstituées (figures non montrées) sont identiques à celui de la protéine R2 sauvage cela indique que la structure du site métallique n'est pas drastiquement perturbée par les mutations.

#### **b) Spectre RPE.**

La résonance paramagnétique électronique (RPE), a été utilisée pour analyser le radical formé dans les protéines mutantes R2. La figure A-I-6 montre que le spectre RPE de tous les mutants a une structure hyperfine identique à

## PARTIE A

celle observée avec la protéine R2 sauvage, indiquant que le noyau aromatique du radical tyrosinyle a la même orientation vis à vis des protons  $\beta$ , que dans R2 sauvage. Les mutations opérées sur la Leu 77, l'Ile 74 et la Val 136 n'affectent pas la structure du signal RPE de la protéine R2.

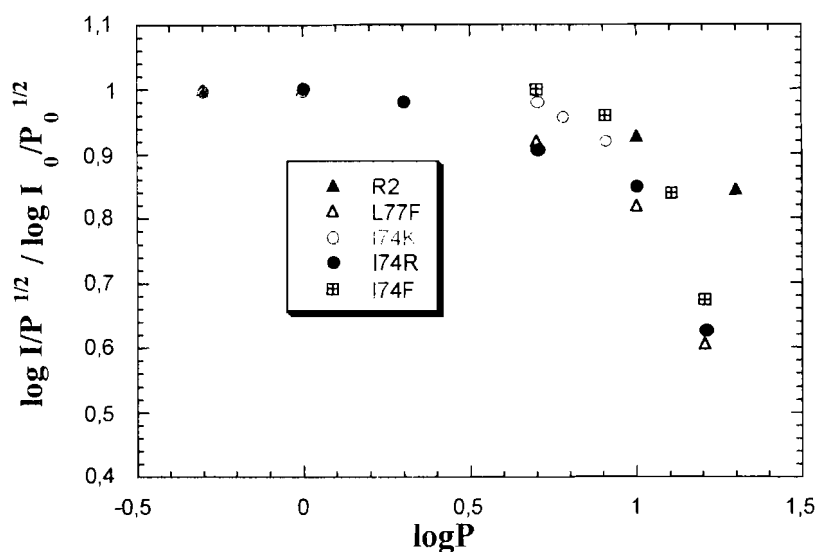


**Figure A-I-6** : Spectres RPE à 100K des protéines R2 (A) type sauvage, (B) I74R, (C) L77F, (D) I74F, (E) I74K, (F) V136N et (G) V136R.

Les spectres sont enregistrés en conditions non saturantes.

La saturation du signal RPE des protéines mutantes a été étudiée à 100K, en faisant varier la puissance du spectromètre BRUKER EPS300E.





**Figure A-I-7:** Courbes de saturation à 100K du signal RPE des protéines R2 sauvage, L77F, I74K, I74R et I74F.

Les courbes de saturation du signal RPE, en fonction de la puissance appliquée (figure A-I-7), indiquent que le signal des mutants sature beaucoup plus facilement que celui de la protéine R2 sauvage. Les différences au niveau de la puissance de saturation sont attribuées, aux différences d'interactions magnétiques, entre le radical tyrosinyle et le centre ferrique (Sahlin et al., 1987). Ces interactions sont beaucoup plus fortes dans la protéine R2 sauvage.

### III-2- Activité enzymatique des protéines mutantes.

Etant donné l'instabilité du radical tyrosinyle des mutants V136R et V136N, nous n'avons pu déterminer leur activité enzymatique.

Pour les autres mutants, nous avons effectué le test d'activité dans les mêmes conditions que pour la protéine R2 sauvage (cf. Matériels et Méthodes paragraphe III-11). Les valeurs d'activité spécifique ont été calculées en nmol de dCDP formé par minute et par milligramme de protéine radicalisée (en tenant compte des teneurs en radical des différentes protéines R2 reconstituées).

## PARTIE A

---

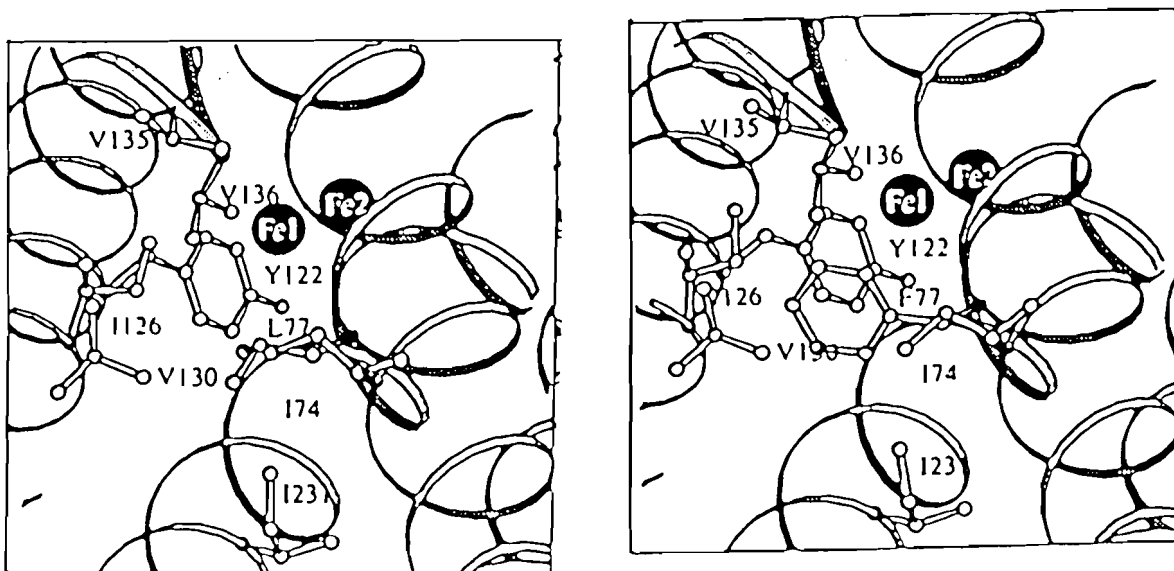
Tous ces mutants sont capables, en présence de la protéine R1 et des autres constituants du test d'activité enzymatique, de catalyser la réduction du CDP avec des activités spécifiques allant de 50 à 100 % par rapport à la protéine R2 sauvage

### **III-3- Influence des mutations sur la structure protéique.**

#### **1-Structure tridimensionnelle des mutants.**

Nous avons essayé, en collaboration avec Hans Eklund (Department of Molecular Biology, Swedish University of Agricultural Sciences Biomedical Center, Uppsala, Sweden), de cristalliser toutes les protéines R2 mutantes obtenues. Les mutants I74F, I74K et I74R ont malheureusement donné des cristaux trop petits pour être analysés et les tentatives de cristallisation des protéines V136R et V136N ont toutes échouées.

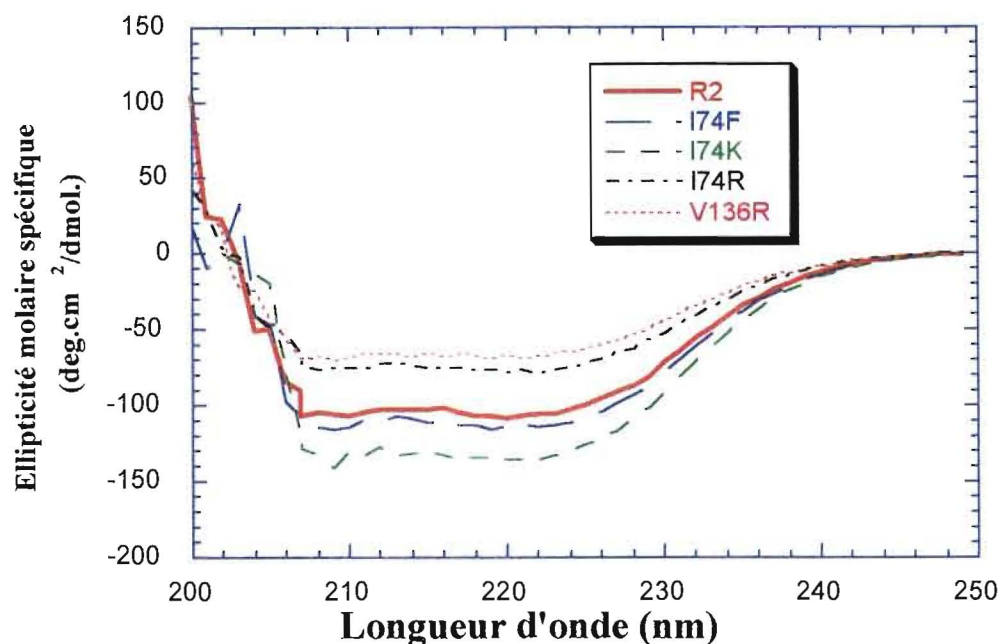
La protéine mutante L77F, par contre, a été cristallisée, et sa structure tridimensionnelle résolue à 2,5Å, en utilisant la structure de R2 sauvage comme modèle initial. La présence de la phénylalanine à la place de la leucine 77 est confirmée par la structure cristalline de L77F (figure A-I-8). Le noyau aromatique de la phénylalanine se place en travers du canal, et encombre le chemin d'accès au radical tyrosinyle. Les deux noyaux aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine) forment des plans perpendiculaires. A part cela, la structure fine de L77F ne présente aucune différence significative dans la conformation de la chaîne polypeptide, comparée à la structure de R2 sauvage.



**Figure A-I-8** : Structure tridimensionnelle du canal hydrophobe des protéines R2 sauvage (à gauche) et L77F (à droite).

## 2- Structure secondaire des mutants.

L'intégrité structurale des mutants est également évaluée en comparant leur spectre de dichroïsme circulaire (CD), avec celui de R2 sauvage. Comme le montre la figure A-I-9 aucune différence notable n'est constatée entre les différents spectres ; le faible écart d'intensité entre les spectres n'est pas significatif et pourrait correspondre à une erreur sur la concentration des échantillons protéiques. Ainsi les mutations ne semblent pas affecter les structures secondaires de la protéine.



**Figure A-I-9** : Spectres de dichroïsme circulaire des protéines R2 sauvage, I74K, I74R, I74F, et V136R.

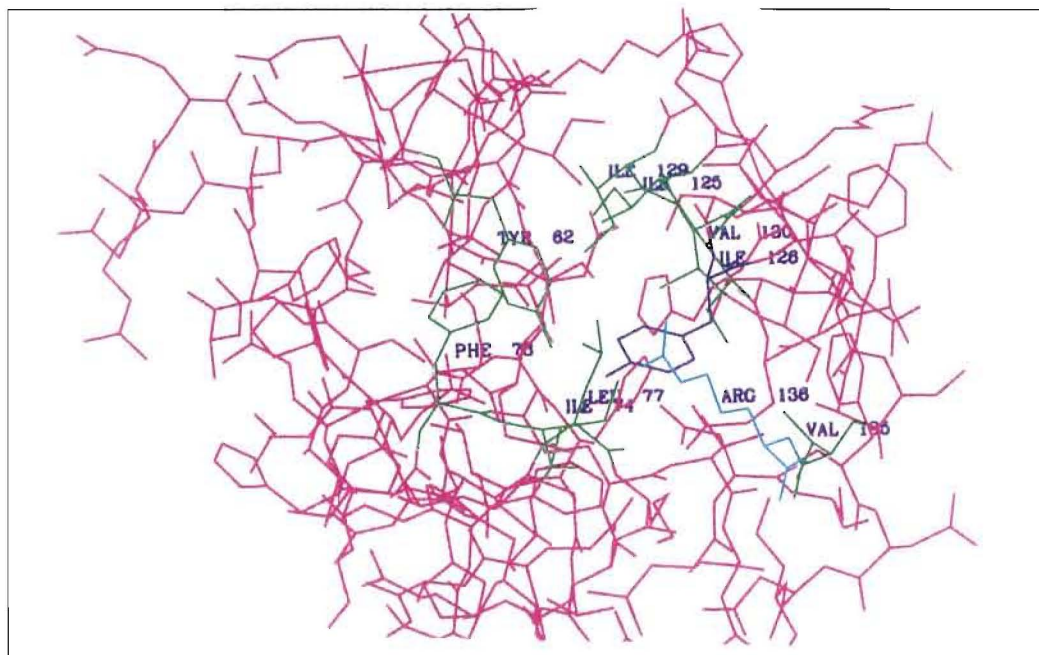
### III-4-Conclusion.

Tous les mutants construits (sauf V136R et V136N), sont capables de former et de stabiliser le radical tyrosinyle, comme dans la protéine R2 sauvage. Ces protéines mutantes R2, peuvent également initier la catalyse de réduction des ribonucléotides, lorsqu'elles sont associées à la protéine R1, dans les conditions appropriées. Nous avons donc pu entreprendre les études sur la réactivité de leur radical tyrosinyle vis à vis de différents piègeurs de radicaux.

La modélisation moléculaire du mutant V136R (figure A-I-10) (et par extension du mutant V136N), a montré que l'extrémité chargée, de la chaîne d'arginine pointe en direction du radical tyrosinyle, et se positionne à proximité de ce dernier, par rapport à la valine 136, dans le type sauvage. La présence de cette charge positive dans l'environnement proche du site radicalaire, peut être une cause de déstabilisation du radical comme nous l'avons remarqué précédemment. Les deux protéines mutantes V136R et V136N purifiées

## PARTIE A

entièrement sous forme apoprotéine, sont capables de reformer le radical tyrosinyle dans des proportions comparables à R2 sauvage (i.e 0,9 radical / R2 pour V136N). Mais une fois formé, ce radical perd automatiquement sa stabilité suite aux changements électrostatiques induits par les mutations.



**FigureA-I-10** : Modèle de la structure tridimensionnelle du mutant V136R.

**Chapitre II : Etude comparative de la réactivité  
du radical tyrosinyle des protéines  
R2 mutantes avec la protéine R2  
sauvage.**

## **PARTIE A**

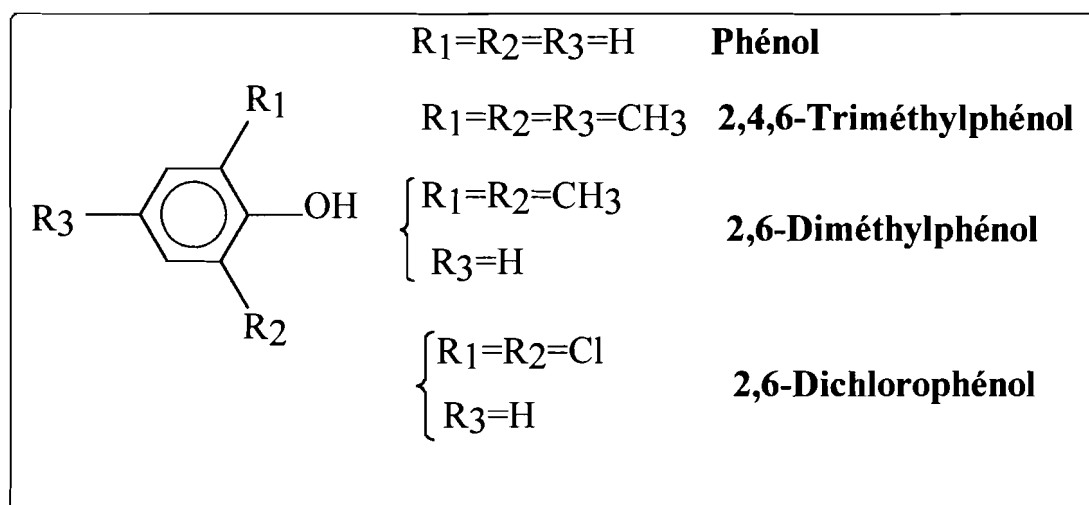
---

## I- Cinétique de réduction par une série de phénols.

### I-1-Introduction.

Des études antérieures, ont clairement montré que le caractère aromatique des agents réducteurs était un facteur important dans la réduction du radical tyrosinyle (Gerez et al., 1992 ; Atta et al., 1993). Par exemple, la réactivité de la phénylhydrazine s'est avérée être environ 100 fois supérieure à celle de l'hydrazine (Gerez et al., 1992) vis à vis du radical tyrosinyle de R2 sauvage. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'effet d'agents réducteurs aromatiques sur des protéines mutantes R2, ayant subies une modification des propriétés électrostatiques de leur site radicalaire.

Les phénols substitués (figure A-II-1) sont des piègeurs efficaces du radical tyrosinyle de la protéine R2 (Atta et al., 1993).



**Figure A-II-1** : Structure des composés phénoliques.

La substitution sur le phénol des hydrogènes par des groupements méthyles, ou chloro permet d'accroître la taille du piègeur de radical. La présence des méthyles, groupements donneurs, sur le phénol en position ortho ou para fait que celui-ci donne plus facilement son atome d'hydrogène, et donc augmente son pouvoir réducteur.



## PARTIE A

### I-2-Résultats.

Les phénols, composés insolubles dans l'eau, sont préparés dans du diméthyl sulfoxide (DMSO). Les protéines R2 sont préparées dans un tube RPE à une concentration de 1 mg/ml, dans un volume final de 200 µl. Après congélation du tube dans l'azote liquide, un spectre de référence (sans réducteur) est tracé. Ensuite on rajoute 2 µl de solution de réducteur à la concentration appropriée. A partir de ce temps  $t = 0$ , des tracés de spectres sont effectués à des intervalles de temps réguliers, correspondant à des périodes d'incubation dans un bain-marie à 37°C. La réduction du radical tyrosinyle est caractérisée par une diminution du signal centré à  $g = 2,0047$ .

Les cinétiques de réduction pour chacune des molécules testées, sont comparées en regardant l'évolution en fonction temps du spectre RPE à 100K du radical tyrosinyle des protéines mutantes R2. Ces résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus avec la protéine R2 sauvage. Les valeurs rapportées dans le tableau A-II-1, représentent le pourcentage de radical restant après 20 min d'incubation à 37°C en présence de réducteur, dans les conditions décrites dans la partie "matériels et méthodes" paragraphe III-12. Pour étudier l'effet du DMSO, nous avons préparé un tube contrôle pour chaque mutant contenant 2 µl de DMSO et nous l'avons incubé à 37°C. Le spectre RPE tracé après ce temps d'incubation ne montre pas de variation d'amplitude du signal du radical tyrosinyle.

Agents réducteurs	Amplitude relative du spectre RPE				
	R2	L77F	I74K	I74R	I74F
Phénol (1mM)	67	52	58	68	60
2,6-Diméthylphénol (0,1mM)	54	10	40	51	35
2,4,6-Triméthylphénol (0,1mM)	45	5	40	36	50
2,6-Dichlorophénol (1mM)	82	15	50	52	68

**Tableau A-II-1** : Réactivité des agents réducteurs aromatiques avec le radical tyrosinyle des protéines R2 sauvage et R2 mutantes. Les concentrations en protéines sont de 1mg/ml. L'amplitude du spectre RPE varie de 100 (pas de réduction du radical) à 0 (réduction totale du radical).

## PARTIE A

---

Les résultats rapportés dans le tableau montrent que :

- Le triméthylphénol et le diméthylphénol sont plus réactifs que le phénol quelle que soit la protéine R2 mutante étudiée. On retrouve le même résultat que pour la protéine R2 sauvage. L'encombrement stérique des composés phénoliques par des groupements méthyles ne semble pas gêner la réduction du radical tyrosinyle. On peut par ailleurs observer la grande réactivité du mutant L77F vis à vis de ces phénols substitués. Ce qui prouve que l'encombrement stérique de ces molécules est moins important que leur caractère hydrophobe.
- Exception faite du mutant L77F, tous les autres mutants réagissent de façon comparable à la protéine R2 sauvage vis à vis des piègeurs de radicaux étudiés. Ceci indique que les mutations opérées sur l'isoleucine 74 ont très peu d'effet sur la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis des piègeurs testés.
- On peut observer que le mutant L77F possède un radical tyrosinyle plus réactif que celui de R2 sauvage et des autres mutants vis à vis de toutes les molécules testées malgré l'encombrement plus important du canal, mis en évidence par les études cristallographiques du mutant L77F. En particulier, on peut souligner la réactivité prononcée de ce mutant vis à vis des phénols substitués qui est de 5 à 9 fois supérieure que dans le cas de R2 sauvage.

## **II-Réduction par la phénylhydrazine, l'hydrazine et l'hydroxylamine.**

### **II-1-Introduction**

L'hydrazine ( $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) et l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) sont connus pour être des réducteurs puissants capables de réduire non seulement le radical tyrosinyle de R2 mais également son centre diferrique (Gerez et al., 1992) dont le potentiel d'oxydoréduction est de  $-115$  mV (Silva et al., 1995). La forme obtenue après réduction de la protéine R2 par ces molécules est donc la forme complètement réduite R2réduit qui en présence d'oxygène, redonne la protéine R2 active radicalisée (cf. Introduction Générale).

Dans le cas de l'hydrazine et de l'hydroxylamine, et contrairement aux études précédentes, nous avons donc du opérer en anaérobiose pour suivre la réduction du radical tyrosinyle. Pour cela, les solutions de réducteurs et le tampon sont d'abord désoxygénés par bullage d'argon pendant 2 à 3 heures. Les protéines sont quant à elles désoxygénées en faisant passer un courant d'argon au dessus de la solution protéique pendant 20 minutes. Les expériences effectuées ont été caractérisées en spectroscopie UV-visible dans la gamme 300-600 nm dans les conditions décrites dans "matériels et méthodes" paragraphe III-12.

En ce qui concerne la phénylhydrazine, il a été montré qu'elle ne réduisait pas le fer de R2 (Gerez et al., 1992) et nous avons donc caractérisé la réduction du radical en RPE dans les mêmes conditions que celles décrites pour la famille des phénols.

### **II-2- Résultats.**

Les expériences de réduction des protéines R2 sauvage et R2 mutantes (1 mg/ml) ont été réalisées avec des concentrations de 10 mM pour l'hydrazine, de 0,1 mM pour la phénylhydrazine et de 0,1 mM pour l'hydroxylamine, ces deux dernières molécules s'étant avérées beaucoup plus réactives vis à vis des centres

## PARTIE A

redox de R2 (Gerez et al., 1992).

Dans le cas de l'hydrazine et de l'hydroxylamine, les cinétiques de réaction pour chacune des protéines R2, ont été comparées en regardant l'évolution en fonction du temps de leurs spectres UV-visible. La réduction du radical tyrosinyle a été caractérisée par le pourcentage de radical restant, calculé à partir du pic d'absorption à 410 nm. La réduction du radical tyrosinyle par la phénylhydrazine a été suivie en spectroscopie RPE à 100K, en observant la diminution du signal centré à  $g=2$ . Le tableau A-3, rapporte les pourcentages de radical tyrosinyle restant après incubation à 37°C des protéines R2 et R2 mutantes, pendant 20 minutes en présence de réducteur.

Protéines	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH <sub>2</sub> (0,1 mM)	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> (10 mM)	NH <sub>2</sub> OH (0,1 mM)
R2	80	74	62
I74K	55	63	56
I74R	63	74	62
I74F	63	70	55
L77F	17	73	31

**Tableau A-3** : Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 sauvage et R2 mutantes par la phénylhydrazine, l'hydrazine et l'hydroxylamine. Dans les deux derniers cas, les protéines R2 sont incubées pendant 20 min en anaérobiose avec le réducteur, et la réduction du radical tyrosinyle est suivie en spectroscopie UV-visible dans les conditions déjà décrites (cf. matériels et méthodes "réduction du radical tyrosinyle").

- On remarque que la substitution d'un hydrogène dans l'hydrazine par un groupement phényle (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHNH<sub>2</sub>) rend le réducteur environ 100 fois plus réactif dans le cas de toutes les protéines R2 bien que cette substitution augmente le potentiel d'oxydoréduction de -1,16V pour l'hydrazine à 250 mV pour la phénylhydrazine. Cette réactivité de la phénylhydrazine est particulièrement prononcée dans le cas du mutant L77F.
- Tous les mutants (y compris le mutant L77F, protéine très réactive vis à vis des phénols) ont la même sensibilité que R2 sauvage vis à vis de l'hydrazine. Ce constat est aussi vrai pour l'hydroxylamine malgré une

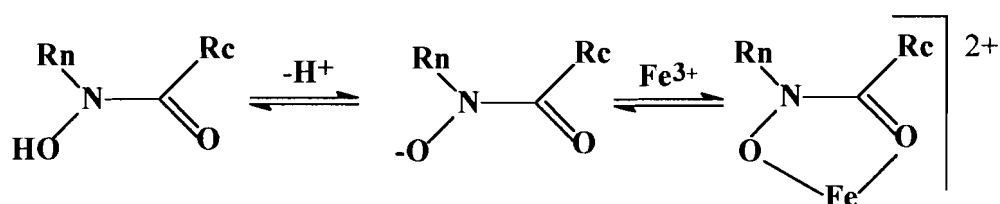
## PARTIE A

réactivité un peu plus marquée pour le mutant L77F. Par contre, en comparant la réactivité de ces protéines avec la phénylhydrazine, on observe une grande différence de sensibilité entre R2 sauvage et le mutant L77F avec 80 % de radical restant pour R2 sauvage contre 17 % pour L77F après 20 min d'incubation à 37°C. La réactivité des autres mutants est comparable à celle de R2 sauvage vis à vis de ce piègeur.

### III-Réduction par l'hydroxyurée.

#### III-1-Introduction.

L'hydroxyurée (HU) fait partie de la famille des acides hydroxamiques, qui sont d'excellents chélateurs du fer (Caudle et Crumbliss, 1994)



**Figure A-II-2** : Complexation du fer par un ligand acide hydroxamique bidentate.

Les acides hydroxamiques présentent un intérêt clinique, étant donné leur capacité à complexer le fer dans le traitement de certaines maladies dues à une surcharge en fer (hémochromatose, thalassémie)(Martell et al., 1981), ou comme agent anti-malaria (Hershko et al., 1992) ou anti-bactérien (Matzanke et al., 1989). Certains acides hydroxamiques ont aussi une activité anti-tumorale (Kacza et al., 1962), même s'il n'a pas été démontré que cette activité est uniquement liée à la fixation du fer.

L'hydroxyurée est l'inhibiteur le mieux connu de la ribonucléotide réductase, et il est utilisé en clinique comme anti-cancéreux pour son activité anti-oxydante. Une réduction à un électron, conduisant à la destruction du radical tyrosinyle a été proposé comme mécanisme pour l'inactivation de l'enzyme (Gräslund et al., 1985 ; Lammers et al., 1983). Dans la protéine R2 d'*E.coli*, le radical tyrosinyle est détruit par HU, alors que le centre diférique

## PARTIE A

reste intact (Karlsson et al., 1992). Cependant chez la souris les deux cofacteurs sont réduits par HU, ce qui conduit à la perte du fer par la protéine (Nyholm et al., 1992).

La constante de réduction du radical tyrosinyle de la protéine R2 d'*E.coli*, par HU (450 mM) est de  $k = 0,46 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( Swarts et al., 1994) à 25°C, ce qui en fait un des réducteurs les plus efficaces parmi les acides hydroxamiques (tableau A-4). La réaction suit une cinétique de second ordre même au-delà de 450 mM en HU, indiquant qu'il n'y a pas de saturation par HU à de fortes concentrations.

Réducteurs	Formules	$k_1/\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Hydroxyurée	$\text{NH}_2\text{CONHOH}$	0,46
Acide acétohydroxamique	$\text{CH}_3\text{CONHOH}$	0,02
Acide benzohydroxamique	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CONHOH}$	0,04
Acide 3,4-dihydroxybenzohydroxamique	$(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CONHOH}$	0,01
Glycine hydroxamate	$^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{CONHOH}$	0,0083

**Tableau A-4** : Constantes de second ordre  $k_1$  (25°C) pour la réduction du radical tyrosinyle de la protéine R2 de la RNR d'*E. coli* avec différents acides hydroxamiques à pH 7.6, I = 0.1M (NaCl) (Swarts et al. 1995).

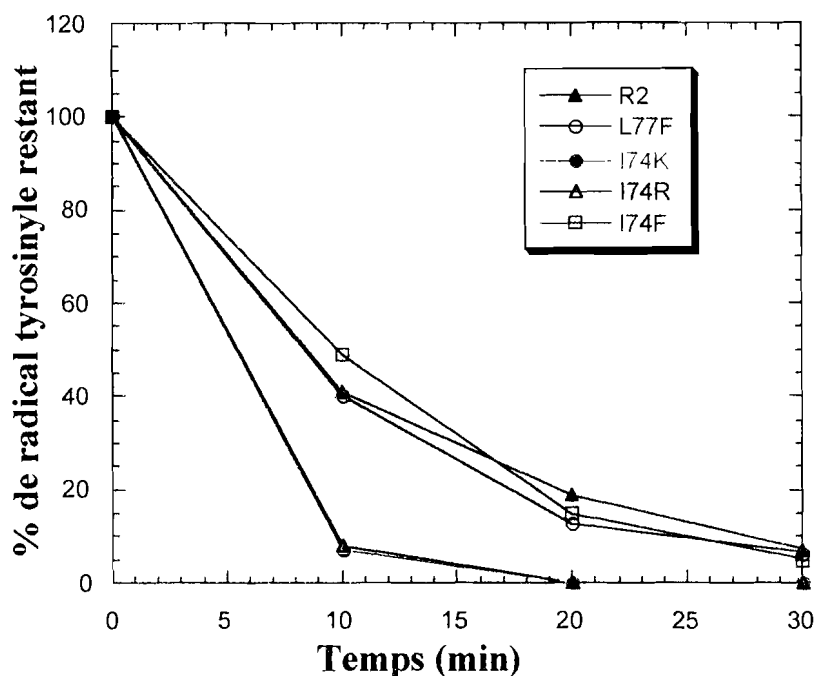
Un radical nitroxyde intermédiaire, de HU a été détecté dans la réaction de HU avec les protéines R2 d'*E.coli* et de souris, montrant que le transfert d'un atome d'hydrogène de HU au radical tyronisyle est le mécanisme dominant dans la réaction d'inhibition (Lassmann et al., 1992).

### III-2-Résultats.

Etant donné l'importance de cet inhibiteur de la RNR, nous avons regardé sa réactivité vis à vis de nos protéines mutantes. Le centre ferrique n'étant pas touché par cet agent dans le cas de la protéine R2 d'*E. coli*, nous avons suivi cette étude en RPE et en aérobiose comme dans le cas des phénols. La figure A-II-3 illustre les cinétiques de réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 et

## PARTIE A

R2 mutantes par HU. La concentration en protéine est de 1 mg/ml, celle en réducteur est de 1 mM et la température d'incubation de 37°C.



**Figure A-II-3:** Réduction par HU (1mM) du radical tyrosinyle des protéines R2 sauvage, et R2 mutantes L77F, I74K, I74R et I74F.

Les courbes obtenues montrent que les mutants L77F et I74F se comportent exactement comme la protéine R2 sauvage vis à vis de HU alors que les deux autres mutants, I74K et I74R, présentent une réactivité nettement plus importante. Il apparaît donc que l'introduction d'un résidu cationique en cette position 74 du canal rend le radical tyrosinyle plus sensible à HU.

### IV-Réduction par des agents réducteurs anioniques.

#### IV-1-Introduction.

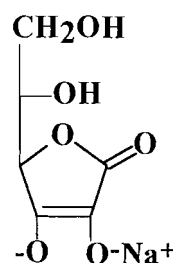
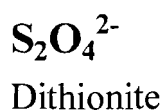
De façon générale, les réducteurs chimiques anioniques (le dithionite  $S_2O_4^{2-}$ , l'ascorbate, les borohydrures ou le glutathion) sont considérés comme de

## PARTIE A

mauvais réducteurs du radical tyrosinyle de R2 (Fontecave et al., 1990). Cela n'est certainement pas dû à un problème thermodynamique de potentiel d'oxydoréduction, puisque toutes ces molécules sont très réductrices. Par contre, étant donné l'environnement du site actif de la protéine R2 vraisemblablement de charge globale négative, il a été suggéré des phénomènes d'interactions électrostatiques défavorables entre ce site, et les réducteurs testés. Dans cette partie du travail, nous avons voulu examiner l'effet produit par les mutations sur la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis de ces agents anioniques.

Nous avons choisi d'utiliser le dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) et l'ascorbate de sodium pour réduire le radical tyrosinyle des protéines mutantes R2.

Les structures de ces deux agents au pH de l'expérience (pH = 7,5) sont données ci-dessous.



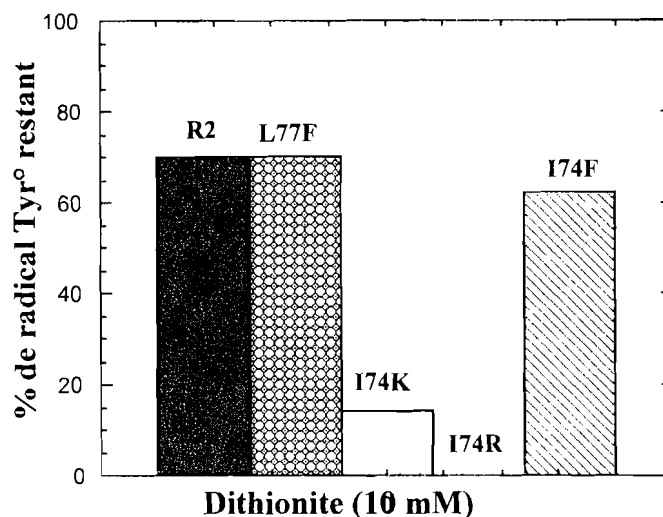
Ascorbate de sodium

### IV-2-Résultats.

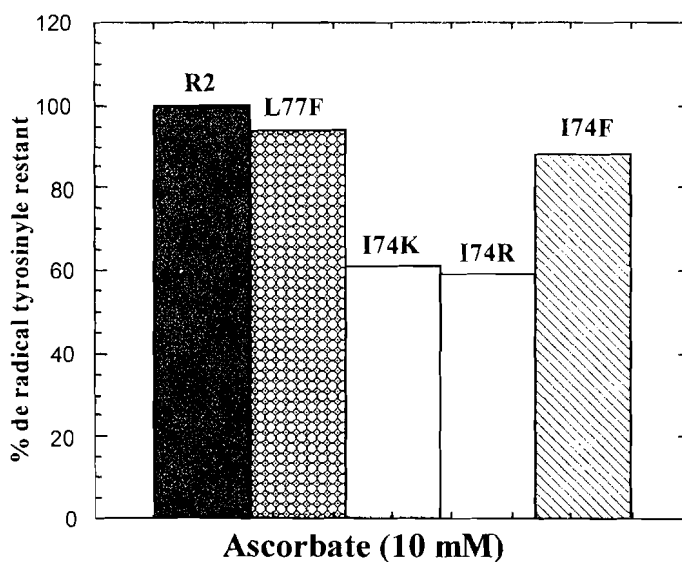
Les études ont été caractérisées en spectroscopie RPE dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Dans les figures A-II-4 et A-II-5, sont rapportés les pourcentages de radical tyrosinyle restant après 20 min d'incubation à 37°C avec le dithionite (10 mM) ou l'ascorbate (10 mM). La concentration en protéine est de 1 mg/ml.



## PARTIE A



**Figure A-II-4** : Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 sauvage et R2 mutantes L77F, I74K, I74R, et I74F par le dithionite. Les valeurs de la figure représentent le pourcentage de radical tyrosinyle restant après 20 min d'incubation à 37°C des protéines (1 mg/ml) en présence de 10 mM de dithionite.



**Figure A-II-5** : Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 sauvage et R2 mutantes par l'ascorbate de sodium (10 mM). Les valeurs de la figure représentent le pourcentage de radical restant après 20 min d'incubation à 37°C de la protéine (1 mg/ml) en présence de réducteur.

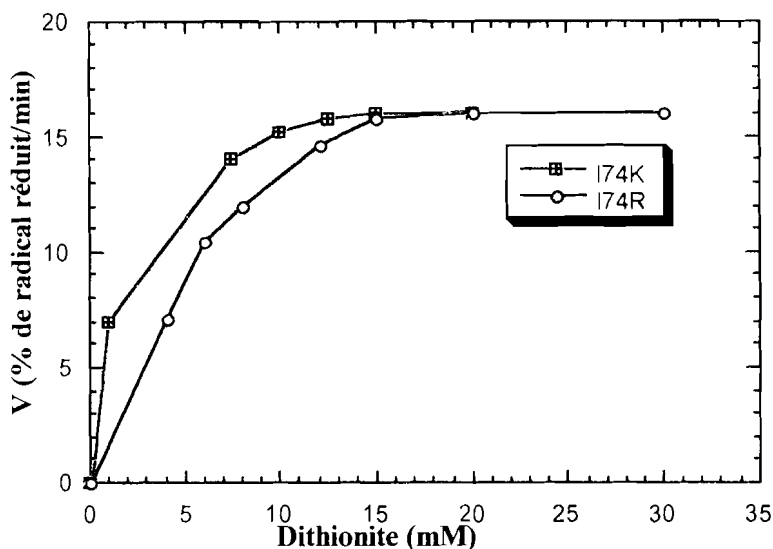
Comme pour la protéine R2 sauvage, le dithionite et l'ascorbate n'ont pratiquement pas d'effet sur le radical tyrosinyle des mutants L77F et I74F. Par contre, comme ce qui avait été observé précédemment pour HU, l'introduction d'un résidu cationique sur la position 74 (I74K et I74R) augmente très fortement la réactivité du dithionite vis à vis du radical tyrosinyle tout comme celle de l'ascorbate bien que de façon moins spectaculaire.

### **V-Cinétique de réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 mutantes I74K, et I74R par le dithionite.**

Jusqu'à présent, l'inefficacité des agents réducteurs anioniques sur le radical tyrosinyle de R2 fut un élément pris en compte dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de la RNR. Cette affinité particulière du dithionite et de l'ascorbate pour les mutants I74K et I74R semble donc assez surprenante. En effet, les mutations Isoleucine 74 en lysine ou arginine induisent une plus grande réactivité du site radicalaire de la protéine R2 vis à vis des agents réducteurs anioniques. Cette particularité pourrait s'expliquer par des phénomènes d'interactions électrostatiques favorables entre la charge positive, introduite par la mutation, et la charge négative des réducteurs rendant le transfert d'électrons au radical tyrosinyle plus efficace.

Quelle est la dépendance de cette réduction vis à vis de la concentration en dithionite ? Pour vérifier cette hypothèse et aller plus loin dans l'étude de cette réactivité particulière du dithionite vis à vis des mutants I74K et I74R, nous avons regardé dans une série d'expériences, les vitesses initiales de la réaction du radical tyrosinyle des mutants I74K et I74R en fonction de concentrations croissantes en dithionite (de 1 à 30 mM). Le temps d'incubation du dithionite avec la protéine est de 5 min à 37°C. Les vitesses initiales de réaction ont été déterminées en pourcentage de radical réduit par minute.

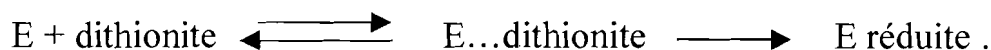
Dans la figure A-II-6 est présentée l'évolution de la vitesse de réduction du radical en fonction de la concentration en dithionite.



**Figure A-II-6** : Vitesse de réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 mutantes I74K et I74R en fonction de la concentration en dithionite .

On observe pour les deux mutants un effet de saturation de cette vitesse de réduction pour des concentrations élevées en dithionite. Ce phénomène est propre aux enzymes dites Michaeliennes lorsque les cinétiques de réaction sont représentées en fonction de la concentration en substrat. Cette saturation est caractéristique de la formation d'un complexe enzyme substrat précédant la réaction .

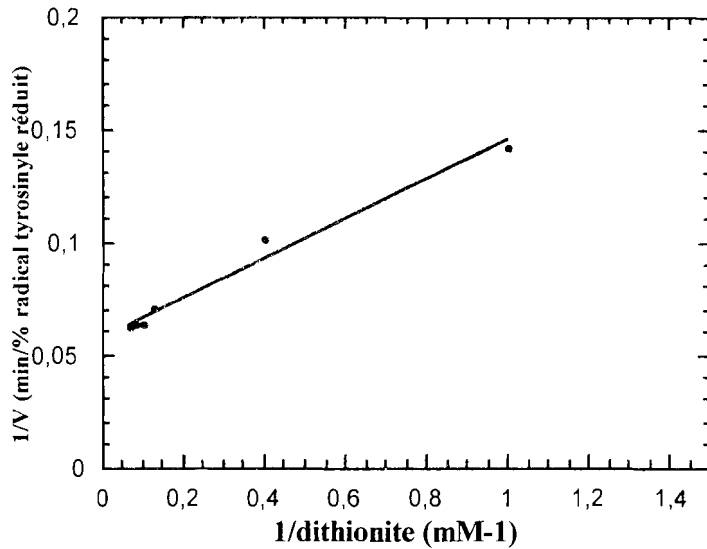
Ainsi , dans le cas de l' inactivation des mutants I 74K et I 74R par le dithionite , on met en évidence la formation d' un complexe R2- dithionite , préalable à l' inactivation de R2 par la réduction du radical tyrosinyle .



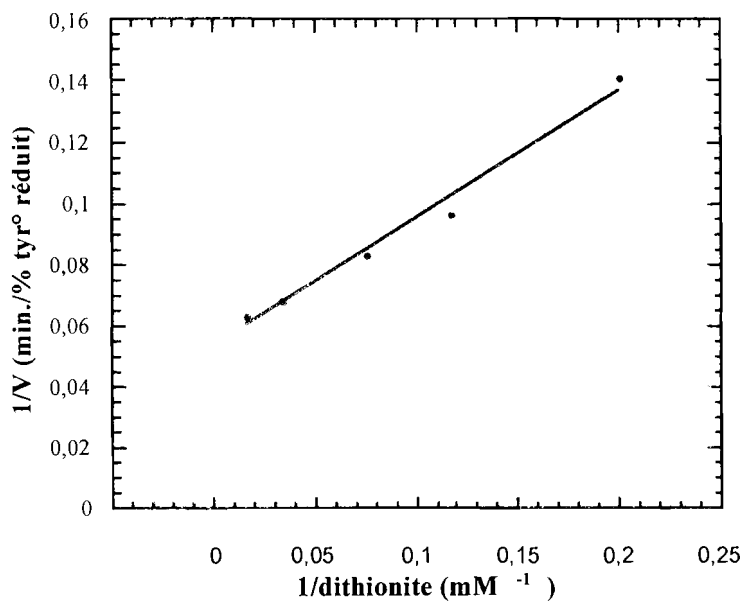
Selon le formalisme de la cinétique de Michaelis-Menten, une représentation en double inverse de la figure A-II-6 ( $1/v_i$  en fonction de

## PARTIE A

1/dithionite) doit conduire à une droite . Ce qui est représenté dans les figures A-II-7 et A-II-8.



**Figure A-II-7:** Représentation en double inverse de la vitesse de réduction du radical tyrosinyle du mutant I74K en fonction de la concentration en dithionite.



**Figure A-II-8 :** Représentation en double inverse de la vitesse de réduction du radical tyrosinyle du mutant I74R en fonction de la concentration en dithionite.

## PARTIE A

Les droites ainsi obtenues coupent l'axe des abscisses en un point correspondant à la valeur  $-1/K_d$ . On déduit de ces représentations, les constantes de dissociation des mutants I74K ( $K_d = 18$  mM) et I74R ( $K_d = 12$  mM).

### VI-Discussion générale.

Le radical tyrosinyle de la RNR d'*E. coli* se situe sur le résidu 122 de la protéine R2, résidu enfoui à l'intérieur de la structure et pourtant cible de nombreux piègeurs de radicaux. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'existence d'un chemin d'accessibilité direct au radical tyrosinyle par lequel pourrait se faire les transferts d'électrons à ce radical. La structure tridimensionnelle de la protéine nous a orienté vers un canal composé d'un grand nombre d'acides aminés hydrophobes que nous avons décidé de modifier par mutagenèse dirigée pour étudier les effets entraînés sur la réactivité du radical tyrosinyle.

Plusieurs critères ont été considérés pour le choix des mutations: les contraintes stériques, le caractère hydrophobe et les paramètres électroniques.

#### ➤ Critères stériques

Nous avons choisi d'encombrer le canal en changeant de petits résidus (valine, leucine, isoleucine) en résidus de plus grande taille (phénylalanine, arginine, lysine) à des positions diverses sur le canal: depuis la surface (V136) à la proximité du radical (L77) en passant par une position médiane (I74).

On pouvait s'attendre à ce que le fait d'encombrer stériquement le supposé chemin d'accès au radical tyrosinyle freinerait la diffusion des molécules utilisées et donc diminuerait la réactivité vis à vis du radical tyrosinyle. Les résultats obtenus montrent au contraire de façon générale que quel que soit l'agent réducteur utilisé, tous les mutants étudiés sont soit aussi réactifs que la protéine R2 sauvage soit plus réactif. Ceci pourrait s'interpréter par le fait que les contraintes stériques au niveau de ce canal ne soit pas un

## PARTIE A

paramètre essentiel pour la réactivité du site radicalaire de R2. Une autre interprétation pourrait être que le canal n'est pas particulièrement encombré par les mutations réalisées et que les résidus introduits ne se positionnent pas à l'intérieur du canal mais à l'extérieur. En absence de structure tridimensionnelle des mutants I74, cette hypothèse est à prendre en considération d'autant plus qu'un examen détaillé de la structure des mutants I74R et I74K en modélisation moléculaire semble aller dans ce sens: l'isoleucine 74 est placée de telle façon que les groupements méthyles à l'extrémité pointent vers l'extérieur de la structure. Les chaînes alkyles des résidus arginine et lysine qui la substituent semble avoir une grande flexibilité et liberté de positionnement et on pourrait imaginer que le canal en définitive ne soit pas significativement encombré par ces résidus (figures non montrées).

Dans le cas de la leucine 77, la structure tridimensionnelle obtenue du mutant L77F, quant à elle, montre clairement que la phénylalanine maintenant en position 77 est à proximité du radical tyrosinyle et diminue l'accessibilité directe à ce radical par ce canal. Pourtant ce mutant s'est avéré être plus réactif que la protéine R2 sauvage vis à vis d'agents tels que le triméthylphénol ou la phénylhydrazine d'assez grande taille.

### ➤ **Le caractère hydrophobe**

D'une façon générale, ce mutant L77F s'est avéré être plus réactif que R2 sauvage lorsque la molécule testée possédait un noyau aromatique dans sa structure, ceci est particulièrement illustré dans le cas de la phénylhydrazine qui est plus de quatre fois plus réactive vis à vis du mutant L77F que de R2 sauvage. Il semblerait que l'introduction d'un noyau aromatique à cette position du canal soit la cause de cette augmentation de réactivité, vraisemblablement en favorisant les interactions hydrophobes avec les molécules aromatiques. En comparant les réactivités des mutants L77F et I74F vis à vis des phénols et des hydrazines, il apparaît que cet effet n'est important que lorsque le résidu aromatique introduit se situe à proximité du radical tyrosinyle: le mutant I74F réagit de façon comparable à la protéine R2 sauvage vis à vis de toutes les molécules testées.

### ➤ Introduction d'une charge

Les mutants I74R et I74K réagissent de façon semblable vis à vis de toutes les molécules testées. Ceci n'est pas très étonnant étant donné que le fait de changer une isoleucine en arginine ou en lysine entraîne le même type de modification chimique: un encombrement plus grand et introduction d'une charge positive. Ces deux mutants ont vis à vis de toutes les molécules neutres testées (exception faite de l'hydroxyurée dont on parlera par la suite) des réactivités comparables à celle de R2 sauvage. Par contre, l'introduction d'une charge positive à cette position 74 accélère de façon nette la réduction du radical tyrosinyle vis à vis d'agents anioniques tels que l'ascorbate et de façon encore plus marquée pour le dithionite, qui sont tous deux de piètres piègeurs du radical tyrosinyle de R2. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un phénomène de saturation pour la réaction entre les mutants I74R et I74K, et le dithionite pour des concentrations allant de 1 à 30 mM en réducteur, qui montre la création d'un site d'affinité de la protéine pour le dithionite vraisemblablement par interactions électrostatiques entre la charge positive introduite par la mutation et la charge négative portée par le substrat. Cette position 74 est assez éloignée du radical tyrosinyle (de 8 à 10 Å) ce qui indique qu'un système a été créé dans lequel un transfert d'électrons à longue distance se produit et peut être étudié.

### ➤ Réactivité des mutants vis à vis de l'hydroxyurée

L'hydroxyurée est sous sa forme neutre à pH 7,5. Il est donc surprenant de constater qu'il se comporte comme les agents anioniques vis à vis des mutants: sa réactivité est augmentée dans le cas des mutants I74R et I74K alors qu'elle reste la même pour la protéine R2 sauvage et dans le cas des mutants I74F et L77F. Par ailleurs, on n'observe pas de phénomène de saturation lors de la réduction des mutants I74K et I74R par des concentrations croissantes de HU comme dans le cas du dithionite. Les bases stéréoelectroniques de ce résultats restent un mystère.

---

### VII-Conclusion et perspectives.

Nous avons montré que les modifications effectuées sur le canal hydrophobe entraînent des variations de la réactivité du radical tyrosinyle. Nous avons mis en évidence en particulier que le fait de changer la leucine 77 en phénylalanine augmentait fortement la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis des molécules possédant un noyau aromatique. Ce résultat semble indiquer que la molécule pénètre dans la structure protéique du mutant L77F pour pouvoir établir des interactions hydrophobes favorables avec le noyau phényle de la phénylalanine. Ceci est appuyé par le fait que la mutation L77F ne modifie pas la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis des autres molécules testées non aromatiques. Pour étudier plus précisément le facteur "encombrement" et confirmer cette hypothèse, il faudrait construire d'autres mutants sur les mêmes positions (par exemple L77N) qui nous permettrait d'encombrer l'environnement immédiat du radical sans introduire de résidu hydrophobe.

On pourrait également tester sur L77F d'autres piègeurs de radicaux non aromatique de plus grande taille que ceux utilisés dans cette étude (par exemple les hydrazines et les hydroxylamines substituées) pour voir si la réactivité du radical tyrosinyle en sort diminuée.

En ce qui concerne la position 74, nous avons vu également que le fait de changer l'isoleucine en un résidu chargé positivement (lysine ou arginine) engendrait un site d'affinité pour les molécules anioniques comme le dithionite et rendait la réduction du radical possible par ce type de molécule. Là aussi pour que ces réducteurs établissent des interactions électrostatiques favorables avec le résidu cationique introduit, il semble vraisemblable que la molécule pénètre dans le canal jusqu'à cette position.

Pour pouvoir dire de façon sûre et sans ambiguïté que ce canal hydrophobe étudié est une voie d'accès au radical tyrosinyle, la construction d'autres mutants serait nécessaire sur les mêmes positions ou sur d'autres positions du canal (V130 et I125 par exemple).



## PARTIE A

---

**PARTIE B**

**ETUDE DE LA REACTIVITE DU RADICAL  
TYROSINYLE DES PROTEINES R2 d'*E. coli*, DE  
*M. tuberculosis*, DE *P. falciparum*, D'*A. thaliana* ET  
DE SOURIS : RECHERCHE DE NOUVEAUX  
INHIBITEURS DE LA RIBONUCLEOTIDE  
REDUCTASE AUX PROPRIETES ANTI-  
PROLIFERATIVES SELECTIVES.**

## PARTIE B

---

**INTRODUCTION**

## **PARTIE B**

---

## PARTIE B

---

La RNR est une enzyme complexe qui intervient dans la biosynthèse de l'ADN. La réduction enzymatique des ribonucléotides par la ribonucléotide réductase régule le pool des désoxyribonucléotides précurseurs de la biosynthèse de l'ADN dans certains virus.

Les cellules de mammifères, comme celles des eucaryotes en général, des virus à ADN comme celles du groupe de virus de l'Herpès et de certaines bactéries notamment *E.coli*, ont en commun une métalloprotéine à fer, composée de sous unités homodimériques non identiques R1 et R2 (Sjöberg et al.1995). Nous avons vu dans l'introduction générale que chacune de ces sous unités représentait une cible potentielle pour les molécules anti-prolifératives. La protéine R1, qui contient les sites de fixation des substrats, peut être inactivée de façon irréversible par des analogues de nucléotides, en particulier ceux substitués en 2' du ribose (Stubbe et Van Der Donk 1995). Une autre stratégie d'inhibition, nous l'avons vu, est liée au fait que l'activité de l'enzyme dépend de la présence sur la sous unité R2 d'un radical tyrosinyle stable.

Un des objectifs majeurs de cette deuxième partie du travail sera de tester de nouvelles molécules ciblées sur le radical tyrosinyle de la protéine R2, dans le cadre d'une inactivation sélective de la ribonucléotide réductase.

(i) Récemment, de nouvelles RNRs de classe I ont été mises en évidence comme celle d'*Arabidopsis thaliana* (Sauge-merle et al., 1997), de *Mycobacterium tuberculosis* (Yang et al., 1994 ; Yang et al., 1997) et de *Plasmodium falciparum* (Chakrabarti et al., 1993). Chez l'homme, *M. tuberculosis* et *P. falciparum* sont les bactéries responsables, respectivement de la tuberculose et de la malaria. Ces deux maladies sont des affections parasitaires graves qui touchent plusieurs millions de personnes, chaque année dans le monde. Les médicaments disponibles pour le traitement de ces maladies deviennent de moins en moins efficaces, suite à des phénomènes de résistance des souches aux drogues traditionnelles. Il devient donc urgent de comprendre la biologie de ces parasites, et si possible d'identifier des nouvelles cibles métaboliques. Le rôle important joué par la RNR dans la biosynthèse de l'ADN, et la division cellulaire

## PARTIE B

---

fait de cette enzyme une excellente cible, pour une chimiothérapie d'autant plus que ces deux microorganismes codent pour leur propre RNR. Jusqu'à présent, l'évaluation de ces RNRs comme cibles potentielles n'a pas encore été faite. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au problème. Dans un premier temps, nous nous sommes proposés de purifier et de caractériser les protéines R2 de *P. falciparum* (PfR2) et de *M. tuberculosis* (MtbR2-2) (chapitre I).

Nous avons ensuite effectué des études comparatives de réactivité des radicaux tyrosinyles de ces protéines dans le but de mettre au point des inhibiteurs de ces RNRs qui soient efficaces et sélectifs (chapitres II, III et IV).

**RESULTATS**



## **PARTIE B**

---

**Chapitre I : Purification et caractérisation  
des protéines MtbR2 et PfR2.**

## **PARTIE B**

---

### I-Purification et caractérisation de la protéine MtbR2.

#### I- 1-Introduction.

*M. tuberculosis* est une bactérie aérobie, gram positive contenant un génome d'environ  $4 \times 10^6$  paires de bases, avec un cycle de reproduction de 24 heures et un temps de réplication chromosomique (période C) de 11 heures (Hiriyama et al., 1986) *M. tuberculosis* peut rester dans un état dormant, forme non répliquative, pendant plusieurs années dans la cellule hôte, le corps humain, et être réactivé sous certaines conditions immunologiques ou d'environnement (Wayne, 1994). Le mécanisme moléculaire qui contrôle cette phase de croissance a été l'objet d'investigation ces dernières années : il implique par exemple l'ADN polymérase I (Huberts et al., 1995) et la topoisomérase I (Yang et al., 1996).

Récemment dans le laboratoire du docteur H. Rubin, la ribonucléotide réductase, potentiellement l'enzyme limitative dans la réplication d'ADN, a été purifiée à partir de *M. tuberculosis* (Yang et al., 1994) et le gène codant pour la sous-unité R2 a été isolé, séquencé et surexprimé dans *E. coli* (Yang et al., 1997). Auparavant, il avait été montré que *Salmonella typhimurium* et *E. coli* possédaient un autre type de gènes, *nrdEF*, codant pour une nouvelle RNR de classe I (la sous classe Ib), laquelle n'est pas exprimée dans les conditions normales de croissance (Jordan et al., 1994, 1994b et 1996). *M. tuberculosis* est le seul organisme actuellement décrit, dans lequel le gène *nrdEF* code pour la forme biologique active de la ribonucléotide réductase (Yang et al., 1994).

Deux gènes, *nrdF1* et *nrdF2*, codant pour la petite sous unité (MtbR2) de la RNR de *M. tuberculosis* ont été identifiés. Ils ont 71 % d'identité au niveau de leur séquence d'acides aminés, et présentent de fortes homologues avec le gène *nrdF* de *Salmonella typhimurium*. Les masses moléculaires de R2-1 et de R2-2 sont respectivement de 36.588 Da (322 acides aminés) et 36.957 Da (324 acides aminés). L'analyse du « western blot » de l'extrait cellulaire de *M. tuberculosis*, indique que les deux protéines R2 sont exprimées in vivo. La protéine

## PARTIE B

recombinante R2-2 possède une activité enzymatique lorsqu'elle est associée à la protéine R1 recombinante de *M. tuberculosis* dans les conditions appropriées. Le gène codant pour MtbR2-1, *nrdF1*, n'est pas lié au gène *nrdF2*, ni à celui codant pour la grosse sous unité, *nrdE*. *M. tuberculosis* est la seule espèce bactérienne identifiée dans laquelle les sous unités de la RNR de classe I ne sont pas alignées sur un opéron. La raison pour laquelle il existe deux gènes *nrdF* différents codant pour deux protéines R2 différentes n'est pas encore connue et est en cours d'investigation. Bien que les deux protéines soient exprimées in vivo, la protéine MtbR2-1 est insoluble dans les conditions d'extraction utilisées. Seules la protéine MtbR2-2 a été purifiée et partiellement caractérisée par Yang et al., 1997. Par soucis de simplification, nous appellerons désormais cette protéine MtbR2.

### I-2-Résultats.

#### I-2-1-Purification de la protéine MtbR2.

Nous disposions au départ d'une souche d'*E. coli* BL21 (DE3), possédant le plasmide pET11a recombinant, contenant le gène codant pour la protéine MtbR2. Cette souche nous a été aimablement fournie par H. Rubin (Philadelphia, U.S.A.).

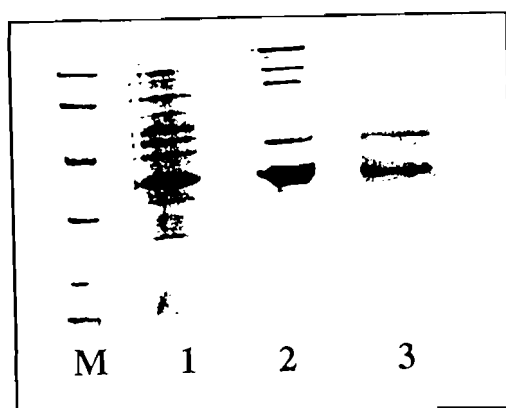
Les cellules recombinantes d'*E. coli* sont incubées à 37°C dans un milieu de culture LB, contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et du sel de mohr (5 µg/ml). Quatre heures après induction à l'IPTG (0,4 mM) à une D.O de 0,4, la culture est arrêtée et centrifugée. L'extraction des protéines se fait avec du KCl (80 mM) et du lysozyme de blanc d'oeuf (0,6 mg/ml) dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7 contenant du DTT 0,1 mM (tampon A) et du PMSF 2 mM.

Nous avons suivi le même protocole de purification que celui précédemment décrit par Yang et al., 1997. La purification de MtbR2 nécessite une seule étape de chromatographie sur une colonne échangeuse d'anions DE52. La colonne est lavée avec 20 ml de tampon A contenant 100 mM de KCl, puis 15 ml de tampon A contenant 200 mM de KCl. La protéine MtbR2 est éluée avec 20 ml

## PARTIE B

de tampon A contenant 300 mM de KCl. On applique un débit de 1 ml/min, et on recueille des fractions de 1 ml. Après cette étape, les fractions contenant la protéine MtbR2 (les spectres UV-visible de ces fractions présentent un pic d'absorption à 410 nm, caractéristique du radical tyrosinyle), sont rassemblées et concentrées, en changeant trois fois le tampon KCl par du tampon Tris 50mM, DTT 0,1mM, pH=7, et la pureté de la protéine est testée sur un gel d'électrophorèse.

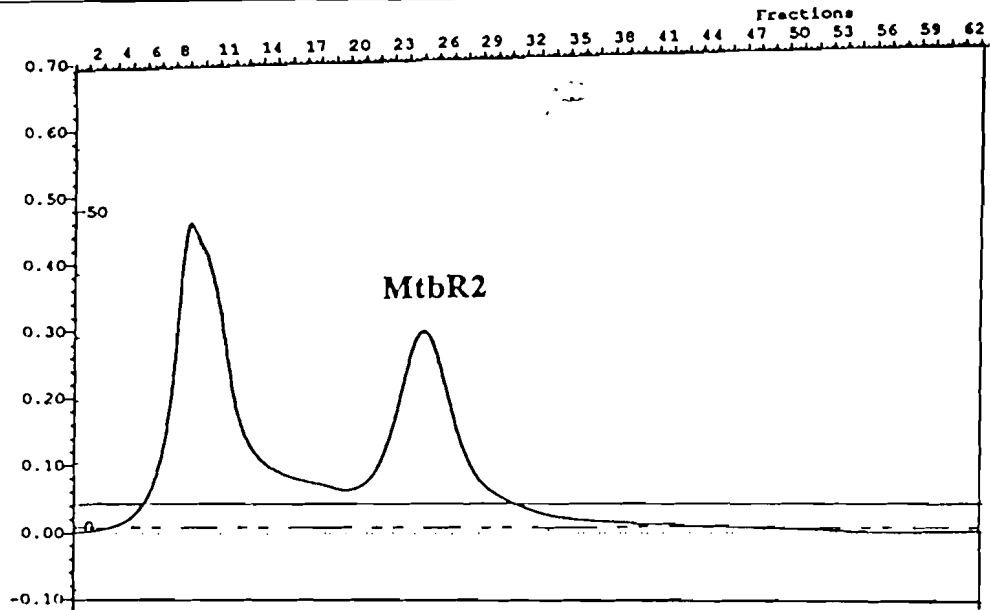
L'analyse de la pureté de MtbR2 sur un gel d'électrophorèse après cette étape de chromatographie nous a montré que le degré de pureté de la protéine à ce stade n'étant pas très élevé (figure B-I-1). La protéine semble contaminée par d'autres protéines de poids moléculaires variés. C'est pourquoi nous avons réalisé une deuxième étape de filtration sur gel en utilisant une colonne superdex 75. Cette étape de purification nous a permis de séparer la protéine sous la forme d'un pic fin bien résolu (figure B-I-2) et avec un degré de pureté satisfaisant calculé à environ 61% (figure B-I-1). Le tableau B-1 donne le bilan des quantités de protéines obtenues dans les différentes étapes de purification ainsi que les degrés de puretés.



**Figure B-I-1** : Gel d'électrophorèse en condition dénaturante.

Purification de MtbR2. 1, Extraits protéiques la souche BL21(DE3) ;  
2, après étape DE52 ; 3, après superdex ; M, marqueurs de  
masse moléculaire.

## PARTIE B



**Figure B-I-2** : Deuxième étape de purification de MtbR2, filtration sur une colonne Superdex 75. L'élution des protéines par du tampon Tris 50 mM, KCl 100 mM, pH = 7.5, est suivie à 280nm.

	Protéines (mg)	degré de pureté
Extraits bruts	117	-
DE 52	32	43 %
Superdex 75	6	61 %

**Tableau B-1** : bilan des étapes de purification de MtbR2.

Ce protocole de purification, en deux étapes de chromatographie, donnant un degré de pureté de la protéine suffisant pour les études envisagées sera dorénavant utilisé lors de chaque purification d'enzyme MtbR2.

### I-2-2-Characterisation.

#### a) Teneurs en fer et en radical tyrosinyle de MtbR2.

Après purification de la protéine, les centres redox de la protéine MtbR2 ont été dosés (tableau B-2). La teneur en fer a été déterminée en utilisant une

## PARTIE B

---

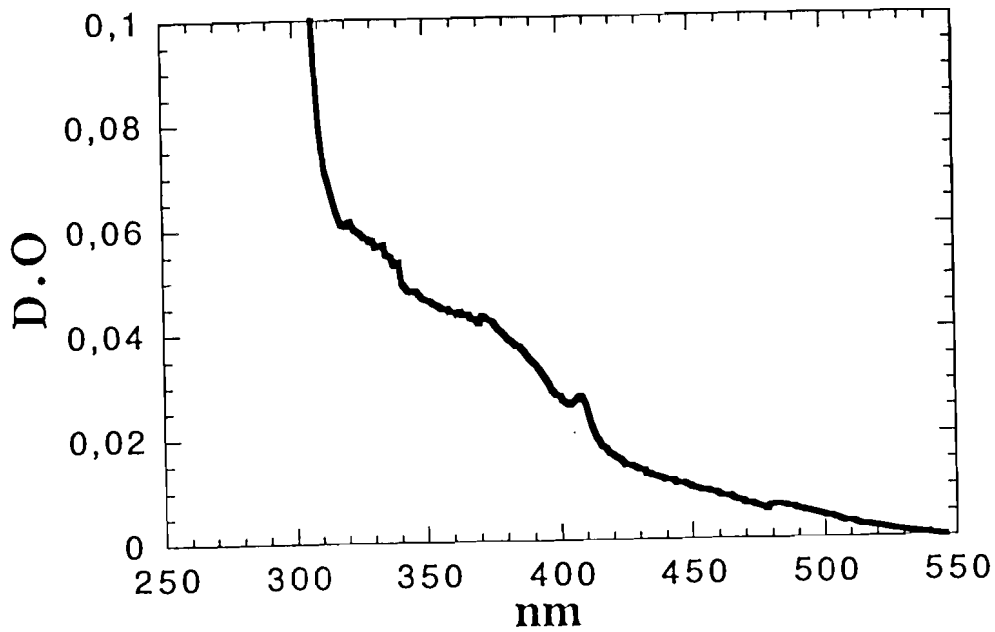
méthode dérivée de celle de Fisch (1985), et qui est basée sur la réaction colorimétrique de la bathophénantroline (cf. matériels et méthodes paragraphe III-8). La quantité de radical par protéine est calculée en spectroscopie RPE à 100K, en conditions non saturantes, en prenant comme référence la protéine R2 d'*E.coli* radicalisée à 100%.

Le dosage des sites métalliques de la protéine après purification donne 1,5 atomes de fer par protéine. Celui du radical tyrosinyle donne 0,4 radical par protéine. Ces valeurs ont été obtenues en tenant compte du degré de pureté de la protéine MtbR2. Etant donné la sous stœchiométrie par rapport à la protéine R2, nous avons effectué des expériences de reconstitution des centres métalliques selon la méthode classiquement utilisée (cf. Matériels et Méthodes paragraphe III-8). La quantité de radical mesurée en RPE reste la même qu'avant reconstitution. Nous avons donc fait varier les conditions expérimentales de cette reconstitution en introduisant dans un premier temps les ions ferreux en anaérobiose et en introduisant l'oxygène ensuite. Le résultat reste inchangé. Nous avons également fait varier l'excès de fer introduit mais toutes nos tentatives sont restées vaines.

### **b) Spectre UV-visible de MtbR2.**

Le spectre UV-visible de la protéine MtbR2, comme les autres protéines R2 présente un pic d'absorption à 408 nm, et une bande d'absorption à 370 nm, caractéristiques respectivement du radical tyrosinyle, et du transfert de charge oxygène fer du centre métallique (figure B-I-3).

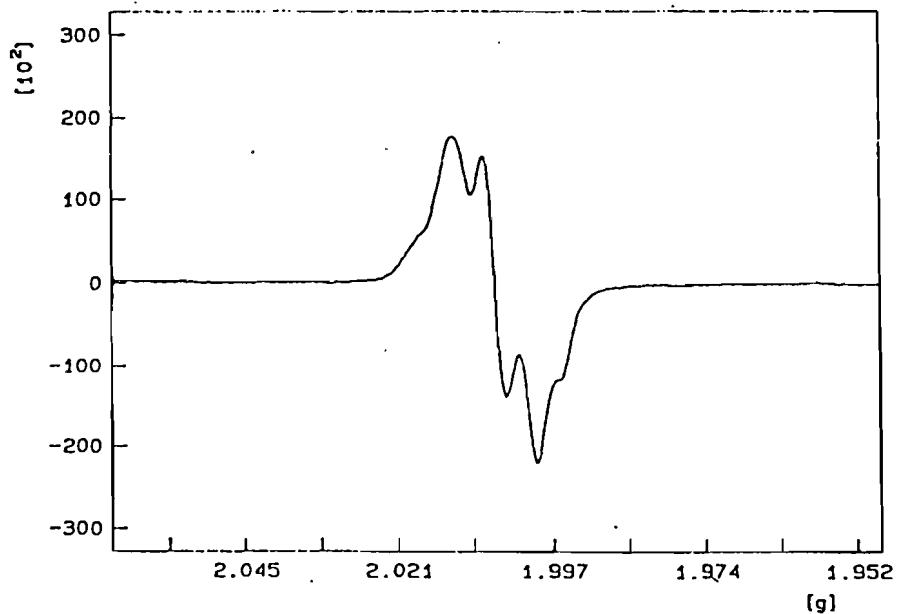




**Figure B-I-3:** spectre UV-visible de MtbR2 13 $\mu$ M de MtbR2 dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH = 7,6.

**c) Caractérisation par RPE du radical tyrosinyle de MtbR2.**

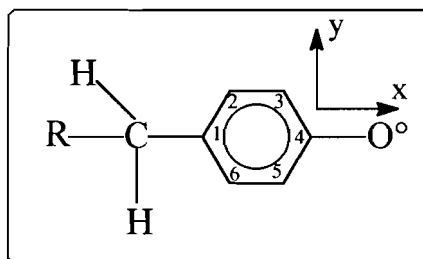
La résonance paramagnétique-électronique a été utilisée pour analyser le radical tyrosinyle formé dans la protéine MtbR2.



**Figure B-I-4:** Spectre RPE de MtbR2 conditions d'enregistrement :puissance 0.3mW ; fréquence 9.47 GHz Modulation d'amplitude 3.12 G.

## PARTIE B

Le spectre RPE de la protéine pure MtbR2 à 100K (figure B-I-4) donne pour le radical une valeur de  $g = 2.0056$ , similaire à celle observée pour le radical tyrosinyle  $Y_D$  du photosystème II (Hoganson et al., 1996) ainsi qu'à celle d'une autre protéine R2 de classe Ib, issue de *Salmonella typhimurium* (Jordan et al., 1994 ; Allard et al., 1996). Cela indique que les protons  $\beta$  de la tyrosine, ont un angle de  $50^\circ$  et  $70^\circ$  par rapport au plan défini par le noyau aromatique, comme dans le photosystème II ou dans *S. typhimurium*. Ces angles sont de  $30^\circ$  et  $90^\circ$  dans la protéine R2 d'*E. coli* de classe Ia. Les différences au niveau du spectre RPE de différents radicaux tyrosinyles sont attribuées à la variation des angles définis par les protons  $\beta$ , le carbone  $\beta$  et le plan formé par le noyau aromatique (Hoganson et Babcock 1992) (figure B-I-5).



**Figure B-I-5** : Numérisation des atomes de carbone de la tyrosine et système de coordonnées pour les valeurs de  $g$ .

Le radical tyrosinyle formé dans MtbR2 est stable, puisqu'on n'observe pas une diminution de l'amplitude du signal RPE, après incubation de la protéine à  $37^\circ\text{C}$ , pendant plus d'une heure.

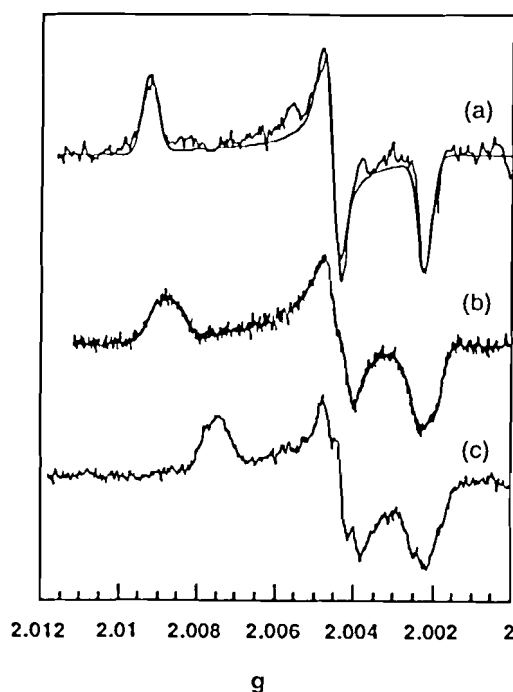
La saturation du signal RPE de MtbR2 a été étudiée à 100K. La puissance maximale de saturation a été calculée en faisant varier la puissance de l'appareil Bruker ESP 300E. La valeur obtenue de 0,3 mW est très faible comparée à celles que nous avons déterminées dans les mêmes conditions pour les protéines R2 d'*E. coli* (14 mW), de souris (pas de saturation jusqu'à 20 mW) et d'*A. thaliana* (pas de saturation jusqu'à 10 mW). Ces résultats démontrent une faible interaction magnétique entre le centre diférique et le radical tyrosinyle dans la protéine MtbR2 par rapport aux autres protéines.

## PARTIE B

Le radical a également été étudié en spectroscopie RPE à haut champ, à une fréquence de 286 GHz à 4K (figure B-I-6) en collaboration avec S. Un (CEA Saclay, Gif sur Yvette). Le spectre RPE à haut champ permet de déterminer la valeur du  $g$  anisotrope du radical (Allard et al., 1996 ; Un et al., 1995). Le spectre RPE à 286 GHz et à 4K de la protéine R2 de la RNR de classe Ib de *M. tuberculosis* présente un signal rhombique, et une simulation de ce dernier nous donne les paramètres suivants :

- $g_x=2,0092$  ;  $g_y=2,0046$  ;  $g_z=2,0022$ .

avec l'axe X, parallèle à la liaison carbone oxygène, et l'axe Y perpendiculaire au plan du noyau aromatique (figure B-I-5). Dans la figure B-I-6, ce spectre est comparé à celui obtenu dans les mêmes conditions pour les protéines R2 d'*E. coli* et d'*A. thaliana*.



**Figure B-I-6** : Spectres RPE à haut champ des protéines R2, (a) *M. tuberculosis*, (b) d'*E. coli*, (c) d'*A. thaliana*. conditions d'enregistrement :  
Fréquence 286 GHz ; Température 4K.

La valeur  $g_x$  est comparable à celle trouvée dans les protéines R2 d'*E. coli* ( $g_x=2,0089$ ) (Un et al., 1995), et R2 de *S. typhimurium* ( $g_x=2,0090$ ) (Allard et

## PARTIE B

al., 1996), mais supérieure à celle des protéines R2 d'*Arabidopsis thaliana* (Sauge-merle et al. 1997), de souris (Un et al., 1995) et du radical Y<sub>D</sub> du photosystème II (Un et al., 1995). Ces valeurs sont regroupées dans le tableau B-3.

Radical tyrosinyle	Valeurs de g <sub>x</sub>	Références
RNR-R2 <i>E. coli</i>	2,0089	Cette thèse
	2,0086	Un et al., 1995
RNR-R2 <i>M.tuberculosis</i>	2,0092	Cette thèse
RNR-R2 <i>S. thyphimurium</i>	2,0090	Jordan et al., 1994
		Un et al., 1995
RNR-R2 souris	2,0076	Un et al., 1995
RNR-R2 <i>A. thaliana</i>	2,0075	Cette thèse
	2,0078	Sauge-merle et al., 1997
PS II (Y <sub>D</sub> )	2,0074	Allard et al., 1996

**Tableau B-3** : Valeurs de g<sub>x</sub> du radical tyrosinyle des protéines R2 d'*E. coli*, de *M. tuberculosis*, de *S. thyphimurium*, d'*A. thaliana*, de souris et du PS II (Y<sub>D</sub>).

Les différences au niveau du facteur g, indiquent une différence dans la structure du site métallique, la nature des ligands ou dans les couplages spin-orbite.

Dans l'étude du radical tyrosinyle des RNRs et du PS II, il est possible de corréler la distribution de spin, la valeur du g anisotrope, et les liaisons hydrogènes de l'oxygène phénolique (Gerfen et al., 1993). De façon théorique, et en se basant sur l'étude de modèles de composés, il a été montré que la présence de liaisons hydrogènes au niveau du substituant oxygène du radical tyrosinyle, réduisait la valeur du g anisotrope (Burghaus et al., 1993 ; Feher et al., 1985).

Les valeurs de g<sub>x</sub> des radicaux tyrosinyles et des radicaux semiquinones présentent également une grande sensibilité à l'environnement électrostatique

## PARTIE B

local (Un et al., 1995). En principe, les contributions électrostatiques des liaisons hydrogènes, des acides aminés ionisés ou d'autres centres chargés peuvent être détectées. En utilisant la structure de la protéine R2 d'*E. coli*, il a été montré que l'environnement électrostatique local du radical tyrosinyle était légèrement positif. La charge positive des deux ions ferriques est compensée par les charges négatives des ligands. Cet environnement électrostatique presque neutre conduit à une valeur de  $g_x$  de 2,0089. Cette valeur est en accord avec les valeurs de  $g$  calculées à partir des orbitales moléculaires pour un radical tyrosinyle dans un environnement légèrement positif. Par contre, le radical tyrosinyle  $Y_D$  du photosystème II a une valeur de  $g_x$  plus faible ( 2,0074 ) résultant d'une influence électropositive de donneurs d'hydrogènes. La valeur élevée du  $g_x = 2,0092$  pour la protéine MtbR2 indique, comme dans R2 d'*E. coli*, que le radical tyrosinyle n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène. Le fait que le  $g_x$  du radical de MtbR2 soit plus grand que le  $g_x$  trouvé pour le radical de R2Ec indique également que l'environnement proche du radical dans MtbR2 est plus électronégatif que celui du radical de R2Ec. Ce résultat est en accord avec celui de l'étude de la saturation du signal RPE de MtbR2 qui a montré une faible interaction magnétique entre le radical tyrosinyle et le centre ferrique. En effet, si cette faible interaction magnétique est due à une distance plus grande entre le radical tyrosinyle et le centre ferrique, l'influence électrostatique du site métallique est dans ce cas également plus faible et explique une valeur du  $g_x$  plus élevée. Une autre interprétation pourrait être la présence d'un résidu anionique supplémentaire dans le proche environnement du radical de MtbR2.

### III- CONCLUSION

Cette étude a permis de caractériser pour la première fois, la sous-unité R2 (MtbR2) de la RNR de classe Ib de *M. tuberculosis*. Comme toutes les RNRs de classe I, la protéine MtbR2 a pour cofacteur un radical tyrosinyle et un centre diferrique. La caractérisation de la protéine en RPE nous a permis de mettre en évidence certains propriétés structurales du site radicalaire, en particulier l'absence de liaison hydrogène avec l'oxygène phénolique du radical et une interaction magnétique entre le radical et le centre métallique plus faible que dans les autres RNRs.

## PARTIE B

---

La stabilité du radical tyrosinyle de MtbR2 nous a permis d'effectuer des études sur la réactivité vis à vis de molécules chimiques (chapitre II).

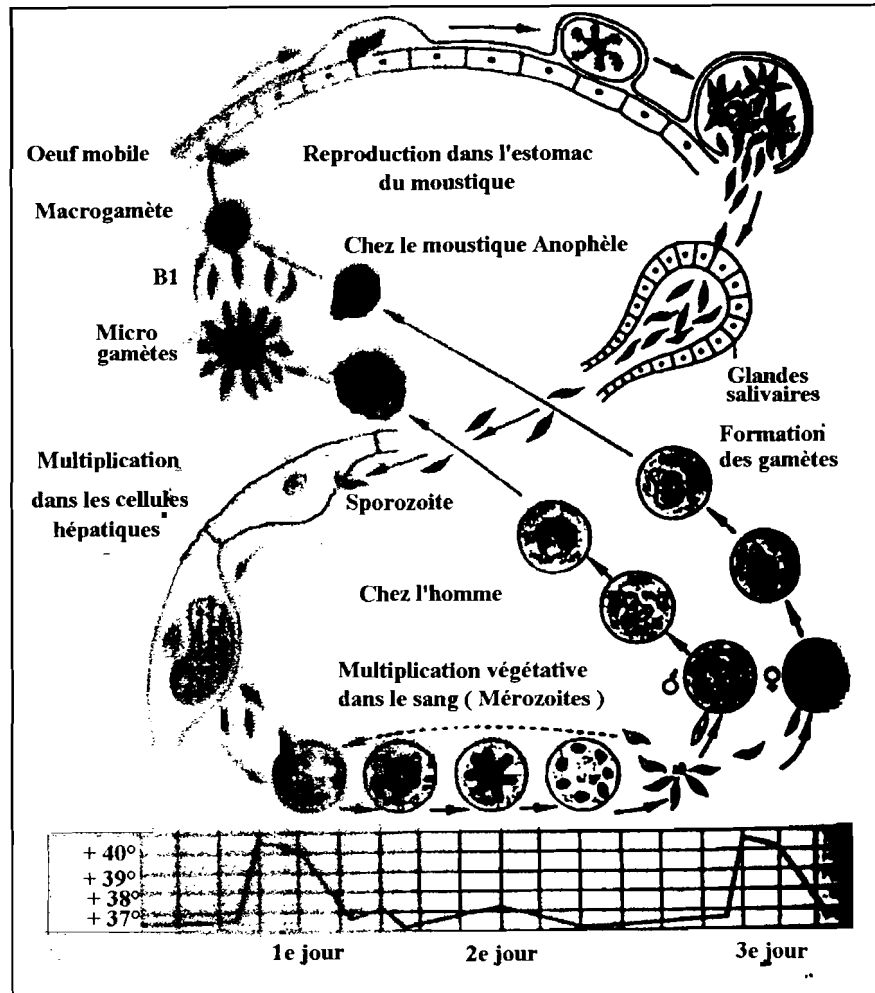
### **II-Purification et caractérisation de la protéine R2 de *P. falciparum* (PfR2).**

#### **II-1-Introduction.**

Les clones d'ADNc codant pour les deux sous-unités de la RNR de *P. falciparum*, ont été isolés par Chakrabarti et al, 1993. Les séquences d'ADN, correspondant à la grande (PfR1) et à la petite (PfR2) sous-unités et qui codent respectivement pour 806 et 349 acides aminés, présentent de larges identités avec les autres RNRs, dans leur base de données. Le parasite *P. falciparum* provoque la malaria (fièvres intermittentes), la maladie infectieuse la plus fréquente de l'homme.

Le cycle de développement du microbe de la malaria commence lorsqu'un moustique, l'Anophèle, inocule à l'homme des germes infectieux. Ces germes, les sporozoïtes, sont en forme de croissants; mêlés à la salive du moustique, ils pénètrent dans le sang où ils vont suivre plusieurs phases. Le cycle de développement de *P. falciparum* est illustré dans la figure B-I-7 :

## PARTIE B



**Figure B-I-7 :** Cycle de développement de l'agent de la malaria (sporozoïtes) et courbe de température.

- La phase endohistiocytaire (asexuée): les sporozoïtes pénètrent dans les cellules des vaisseaux sanguins et du foie où ils grossissent, leur noyau se multiplie, puis ils se divisent et engendrent de nombreuses cellules filles uninuclées, (les médicaments agissent peu sur la période d'incubation) qui à leur tour infectent une nouvelle cellule.
- Puis durant la phase endoérythrocytaire (asexuée), ces cellules pénètrent dans les globules rouges du sang où elles se multiplient de nouveau par schizogonie et engendrent chacune 8 à 20 mérozoïtes. Ceux-ci envahissent et détruisent à leur tour d'autres globules rouges; à cette destruction des globules correspondent des accès de fièvre.

## PARTIE B

- D'autres part les cellules infectées se transforment en cellules femelles ou mâles. En piquant un homme paludéen, l'Anophèle avale avec son sang ces cellules femelles ou mâles:alors commence, dans l'intestin du moustique, la phase sexuée: il y a fécondation, l'oeuf (copula) pénètre dans la parois stomacale.
- Là, il se multiplie ; cette sporogonie engendre d'innombrables sporozoïtes qui émigrent dans les glandes salivaires de l'Anophèle et ils seront de nouveau inoculés à l'homme.

Plus de la moitié de la population mondiale est exposée à cette maladie qui provoque la mort de 1 à 2 millions de personnes chaque année dans le monde;mais les médicaments disponibles pour le traitement de cette maladie (en général la quinine) sont de moins en moins efficaces suites à des phénomènes de résistance des souches aux drogues utilisées, et dans l'immédiat la possibilité d'un vaccin est incertain. Ainsi donc, il devient urgent de mieux connaître la biologie de ce parasite en détail et si possible de déterminer de nouvelles cibles métaboliques. Dans ce but, nous avons envisagé de purifier et d'étudier la protéine R2 de de la RNR de *P. falciparum*, qui est une enzyme importante pour le développement du parasite durant le cycle cellulaire.

### II-2-Purification de PfR2.

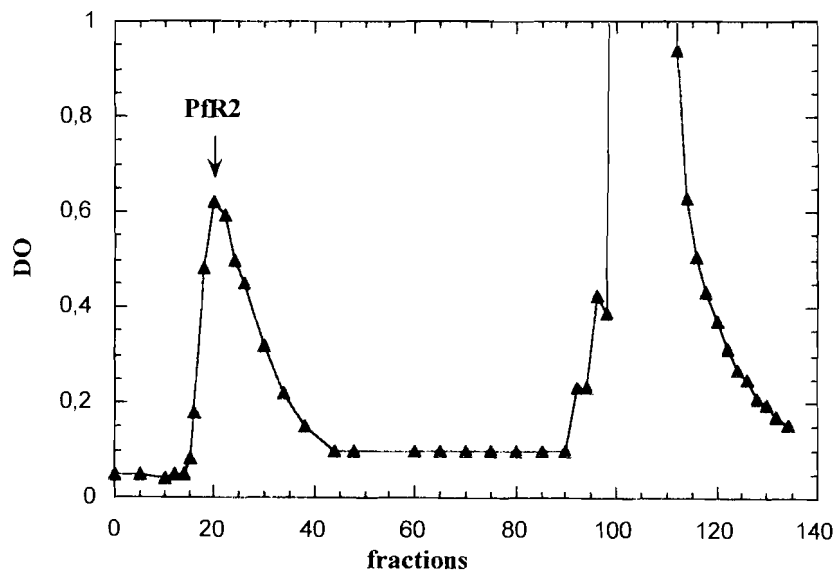
Nous avons tout d'abord surexprimé la protéine R2 de *P. falciparum* (PfR2) à partir du plasmide PfR2(pET11) qui porte le gène de PfR2 et qui nous a été fourni par H. Rubin (Philadelphie, USA). Nous l'avons utilisé pour transformer la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. La croissance a été effectuée à 37°C en milieu LB (3 litres de culture) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et la surproduction initiée par induction à l'IPTG (0,4mM) à une DO de 0,3. Cinq heures après le début de la croissance, la culture est centrifugée et le culot de bactéries est repris par du tampon Tris-HCl 50 mM, pH7,5 contenant du DTT 5 mM et du PMSF 1 mM. L'extraction des protéines se fait par sonication de la solution cellulaire. Les acides nucléiques sont précipités avec une solution de sulfate de streptomycine à une concentration finale de 2,5 % et les protéines avec du sulfate d'ammonium à



## PARTIE B

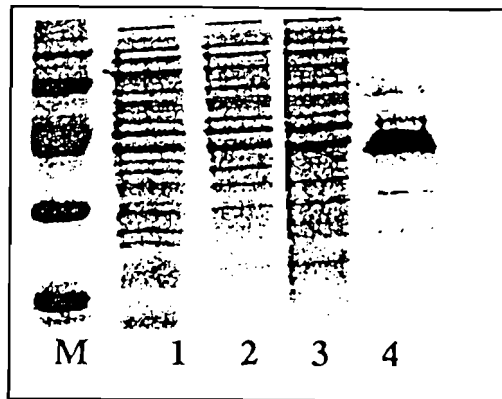
60 % de saturation. Le culot de protéines est resuspendu dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH7,5 contenant du DTT 5 mM et passée sur une colonne de filtration Sephadex G25 pour éliminer l'excès de sulfate d'ammonium.

Lors de l'étape de chromatographie sur la colonne échangeuse d'anions DE52 (volume de 40 ml) (figure B-I-8) préalablement équilibrée avec du tampon  $\text{KPO}_4$  10 mM contenant du KCl 30 mM et du PMSF 1 mM, et après dépôt de la solution protéique, la colonne est lavée avec 3 volumes du même tampon ; puis la protéine Pfr2 est éluée avec 120 ml de tampon  $\text{KPO}_4$  10 mM contenant du KCl 70 mM. Le reste des protéines fixées sur la colonne est décroché avec 50 ml de tampon  $\text{KPO}_4$  10 mM contenant du KCl 300 mM. La présence de la protéine est analysée sur gel SDS/page en conditions dénaturantes où elle est caractérisée par une bande à 40,6 kDa. Les fractions 15 à 40 contenant la protéine sont rassemblées et concentrées.



**Figure B-I-8** : purification de Pfr2 : colonne échangeuse d'anions DE52.

En partant de trois litres de culture de *E.coli* BL21 (DE3), on obtient 200 mg de protéines dans les extraits et 11 mg de protéine Pfr2 pure à 75% comme le montre l'analyse du gel SDS/page de la protéine purifiée (figure B-I-9).

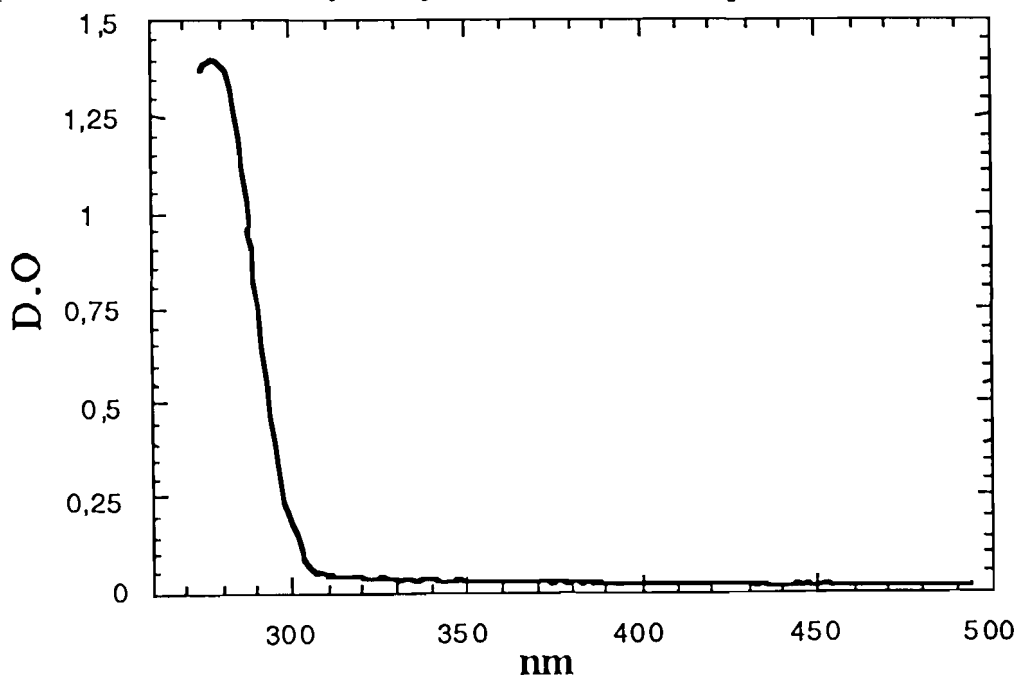


**Figure B-I-9** : gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes : purification de Pfr2. 1, extraits protéiques de la souche BL21 (DE3) ; 2, après sulfate de streptomycine ; 3, après sulfate d'ammonium ; 4, après étape DE52 ; M, marqueurs de masse moléculaire.

## II-3-Caractérisation de Pfr2.

### II-3-1-Spectre UV-visible de la protéine Pfr2.

Comme le montre la figure B-I-10, le spectre UV-visible de la protéine Pfr2 ne présente pas de bandes d'absorption caractéristiques du centre métallique ou du radical tyrosinyle. Ceci indique que Pfr2 est purifiée entièrement sous forme apoprotéine, sans radical tyrosinyle ni centre métallique.



**Figure B-I-10**: Spectre UV-visible de la protéine Pfr2.

La réactivation de la protéine PfR2 par la méthode de reconstitution des centres métalliques, décrite par ailleurs, a donc été appliquée. Dans les conditions standards de reconstitution des protéines R2, la protéine PfR2 ne présente aucun signal en spectroscopie RPE à 100K (fréquence 9,47 GHz ; modulation d'amplitude 3,12 G ; puissance 10 mW) ce qui montre que le radical tyrosinyle n'est pas formé dans ces conditions. Nous avons alors fait varier les conditions expérimentales de cette reconstitution en introduisant d'abord les ions ferreux en anaérobiose, puis après l'oxygène. Le résultat reste inchangé.

### **II-3-2-Séquence de la partie N-terminale de PfR2.**

Etant donné notre étude dans la reconstitution de la protéine nous pouvions avoir des doutes sur l'identité de la protéine purifiée. C'est pourquoi nous avons eu l'idée de déterminer sa séquence N-terminale. La séquence N-terminale de la protéine PfR2 purifiée lors de ma thèse a été réalisée par Jean Gagnon à l'Institut de Biologie Structurale (IBS). La séquence trouvée (figure B-I-11) a été comparée à la séquence répertoriée dans les banques de données sous le numéro d'accèsion P50650. Si on ne prend pas en compte les deux premiers acides aminés qui pourrait appartenir au vecteur, la séquence déterminée est identique à la séquence N-terminale de PfR2 ce qui montre sans ambiguïté l'identité de la protéine purifiée.

A S M A D V I N I S R I P I F S Q E R E F S D L

**Figure B-I-11** : Séquence N-terminale de la protéine PfR2.

### **II-4-Conclusion.**

La sous-unité R2 de *P. falciparum* a été purifiée une seule étape de chromatographie, une colonne échangeuse d'anions DE52, avec un degré de pureté satisfaisant (75 %) mais sous sa forme apoprotéine qui à l'heure actuelle n'a pas pu être réactivée. Des études plus fines sur les conditions de réactivation

## PARTIE B

---

sont envisagées tous comme une étude en spectroscopie UV-visible afin de voir si les sites métalliques sont occupés par les atomes de fer ajoutés ( on devrait alors voir la bande métallique du fer à 370 nm). Si tel était le cas, il faudrait essayer de comprendre pourquoi le centre à fer est incapable d'oxyder la tyrosine. Etant donné l'absence de radical tyrosinyle dans cette protéine Pfr2, nous n'avons pas pu poursuivre les études envisagées sur sa réactivité.

## **PARTIE B**

---

**Chapitre II : Etude comparative de la réactivité  
des protéines R2 d'*E.coli*, de *M.  
tuberculosis*, d'*A. thaliana* et de  
souris.**

## **PARTIE B**

---

### I- Introduction.

Après la purification et la caractérisation de nouvelles protéines R2 de la ribonucléotide réductase d'espèces telles que *M. tuberculosis* et *A. thaliana*, l'étude de la réactivité du radical tyrosinyle de ces enzymes devrait nous permettre de tirer d'importantes informations sur une possible régulation contrôlée de leur activité réductase.

Cette étude est particulièrement intéressante dans le cas d'un micro-organisme pathogène tel que *M. tuberculosis*. Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.), un tiers de la population mondiale, environ deux milliards de personnes, aurait déjà été infecté par la tuberculose. Cette maladie émergente, provoque la mort de plusieurs millions de personnes chaque année, surtout dans les pays du tiers-monde. Or, on observe de plus en plus une résistance de la bactérie à certains médicaments utilisés jusqu'à présent. Le développement de nouvelles approches pour une thérapie anti-tuberculeuse devient donc nécessaire.

Les RNRs de classe Ib dont fait partie la RNR de *M. tuberculosis* ne sont pas parfaitement caractérisées (Jordan et al., 1994 et 1996 ; Yang et al., 1994) et on ne connaît pas grand chose sur leur réactivité.

La protéine R2 de souris (M2), représentant celle des mammifères, est un excellent modèle d'étude de la régulation de la RNR de l'homme puisque ces deux protéines présentent de nombreuses similitudes. Dans ce cas précis, le contrôle de l'activité ribonucléotide réductase pourrait nous permettre de déterminer de nouvelles molécules anti-tumorales, capable de limiter la prolifération cellulaire et surtout moins toxiques que celles utilisées de nos jours.

La sous-unité R2 d'*A. thaliana* (R2V), avec une masse moléculaire de 39200 Da pour 340 acides aminés (Sauge-merle et al., 1997) présente 64 % d'identité de séquence avec la protéine R2 de souris (figure B-II-1) et contient tous les résidus impliqués dans la structure des deux cofacteurs (centre ferrique,



## PARTIE B

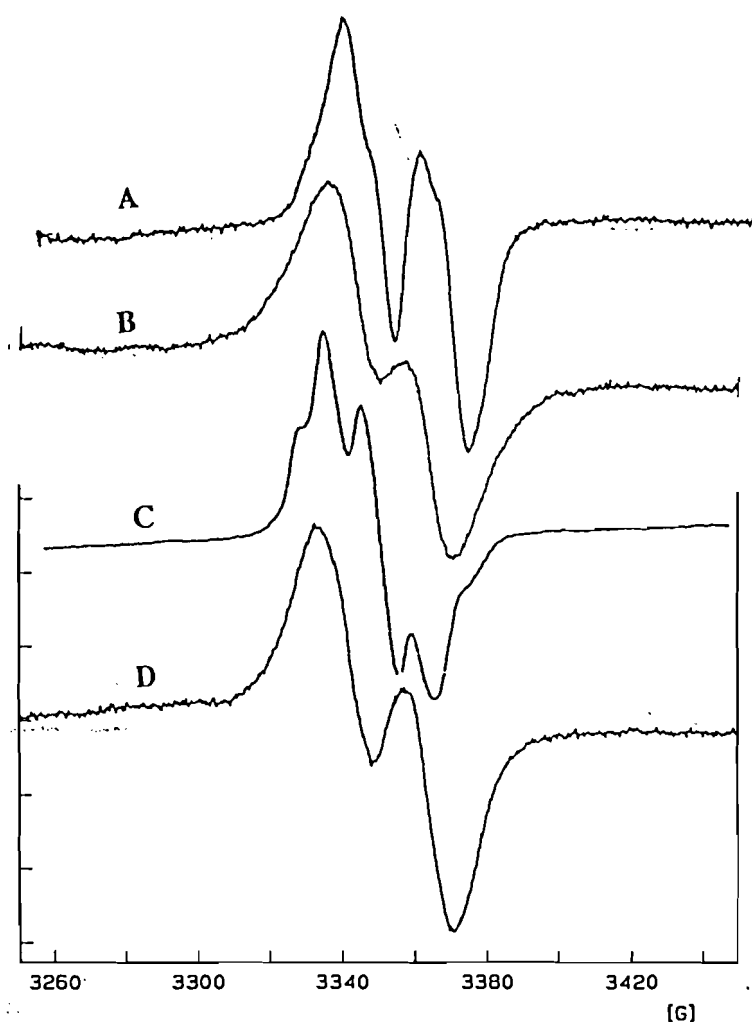
radical tyrosinyle). Avec *A. thaliana*, seul représentant des végétaux supérieurs dont la protéine R2 recombinante a été clonée, surexprimée et caractérisée en détail (Sauge-merle et al., 1997), il serait possible de développer de nouvelles drogues (par exemple des herbicides), en vue d'une inhibition sélective de la croissance des plantes.

	<b>1</b>		<b>60</b>
<i>E. coli</i>	AYTTFSQTKN	DQLKEPMFFG QPVNVARYDQ QKYDIFEKLI EKQLSFFWRP	EVDVSRDRI
<i>A. thaliana</i>	KEGQGRDMEE	GESEEPLEMA QNQRFTMFPI .RYKSIWEMY KKAEASFWTA	EEVDLSTDVQ
Souris	ELESKAPTNP	SVEDEPLLRE NPRRFVVFPI .EYHDIWQMY KKAEASFWTA	EEVDLSKDIQ
			<b>120</b>
<i>E. coli</i>	DYQALPEHEK	HIFISNLKYQ TLLDSIQGRS PNVALLPLIS IPELETWVET	WAFSETIHSR
<i>A. thaliana</i>	QWEALTDSEK	HFISHILAFF AASDGIVLEN LAARFLNDVQ VPEARAFYGF	QIAMENIHSE
Souris	HWEALKPDER	HFISHVLAFF AASDGIVNEN LVERFSQEVQ VTEARCFYGF	QIAMENIHSE
			<b>180</b>
<i>E. coli</i>	SYTHIIRNIV	NDPSVVFDDI VTNEQIQKRA EGISSYYDEL IEMTSYWHLL	GEGTHTVNGK
<i>A. thaliana</i>	MYSLLLETFI	KDSKEKDRLF NAIETIPCIS KKAKWCLDWI Q- - - - -	- - - - -
Souris	MYSLLIDTYI	KPKKEREYLF NAIETMPCVK KKADWALRWI GDKEATY- -	- - - - -
			<b>240</b>
<i>E. coli</i>	TVTIVSLRELK	KKLYLCLMSV NALEAIRFYV SFACSFAPAE RELMEGNAKI	IRLIARDEAL
<i>A. thaliana</i>	-----SP	MSFAVRLVAF ACVEGIFFSG SFCAIFWLKK RGLMPGLTFS	NELISRDEGL
Souris	-----	---GERVAVF AAVEGIFFSG SFASIFWLKK RGLMPGLTFS	NELISRDEGL
			<b>300</b>
<i>E. coli</i>	HLTGTQHMLN	LLRSGADDPE MAEIAEICKQ EGYDLFVQAA QQEKDWADYL	FRDGS MIGLN
<i>A. thaliana</i>	HCDFACLLYS	LLQK----- -----QLPL EKVYQIVHEA VEIETEFVCK	ALPCDLIGMN
Souris	HCDFACLMEK	HLVHKPAEQR VREIIT- - NAVRIEQEFL TEALP-----	---VKLIGMN
			<b>360</b>
<i>E. coli</i>	KDILCQYVEY	ITNIRMQAVG LDLPFQTRSN PIPWINTWLV SDNVQVAPQE	VEVSSYLVGQ
<i>A. thaliana</i>	SNLMSQYIQF	VADRLLVTLG CERTYKA--- ENPFDWMEFI SLQKTNFFE	KRVGEYQKAS
Souris	CTLMKQYIEF	VADRIMLELG FNKIFRVENP FDFMEN---I SLEKTNFFE	KRVGEYQRMG
			<b>375</b>
<i>E. coli</i>	IDSEVDTDDL	SNFQL	
<i>A. thaliana</i>	VMSNLQNGNQ	NYEFTTEEDF	
Souris	VMSNSTENSF	TLDAF	

**Figure B-II-1** : Comparaison des séquences acides aminés des protéines R2 d'*E. coli*, d'*A. thaliana* et de souris.

## PARTIE B

Il faut rappeler que ces quatre protéines R2 d'*E. coli* (R2 Ec), R2 de *M. tuberculosis* (MtbR2), R2 d'*A. thaliana* (R2V) et R2 de souris (M2) appartiennent toutes à la RNR de classe I, et ont comme cofacteurs un radical tyrosinyle et un centre binucléaire de fer. Les spectres RPE à 100 K de ces protéines pures sont montrés dans la figure B-II-2.



**Figure B-II-2** : Spectres RPE à 100 K des protéines R2 d'*E. coli* (A), R2V (B), MtbR2 (C), et M2 de souris (D). Les spectres sont enregistrés en conditions non saturantes : (10 mW pour R2 d'*E. coli* et R2V ; 0,3 mW pour MtbR2 et 20 mW pour M2 de souris) ; fréquence : 9,41 GHz ; modulation d'amplitude : 3,122 G.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes proposés de tester la réactivité du radical tyrosinyle vis à vis d'une série d'agents réducteurs présentés dans les chapitres précédents : l'hydroxyurée, les phénols, la phénylhydrazine et

## PARTIE B

---

surtout de nouvelles molécules anti-oxydantes que sont les thiols aromatiques et le resvératrol. Ces nouvelles molécules seront étudiées en détail dans les chapitres suivants.

La comparaison de l'effet de ces différents inhibiteurs sur le radical tyrosinyle de la RNR de ces espèces, aura pour but d'identifier des inhibiteurs efficaces et spécifiques permettant une élimination sélective d'un organisme donné.

### II- Résultats

Les protéines R2 sont dissoutes dans 150  $\mu$ l de tampon Tris/HCl 0,1 M pH7,5 de manière à obtenir une concentration finale en radical tyrosinyle de 10  $\mu$ M. La solution est transférée dans un tube RPE et un spectre de référence est tracé. Après l'addition d'un petit volume (2 à 4  $\mu$ l) de solution de réducteur, le mélange réactionnel est incubé en aérobiose à 37°C pendant 10 minutes. La teneur en radical est déterminée à partir de l'amplitude du signal RPE centré à  $g = 2$  qui varie de 100 (pas de réduction du radical tyrosinyle) à 0 (réduction totale du radical). Un tube témoin a été réalisé avec chacune des protéines R2, et a montré qu'après 10 min d'incubation à 37°C, les protéines R2V et M2 perdent respectivement 10 % et 20 % de leur teneur en radical tyrosinyle, alors que le spectre RPE des protéines R2 Ec et MtbR2 reste inchangé. Dans le tableau B-4, sont reportés les pourcentages de radical tyrosinyle restant après incubation en présence de réducteur des protéines R2 d'*E. coli*, MtbR2, R2V et M2, en tenant compte des pertes de radicaux dans R2V et M2.

## PARTIE B

Réducteurs	R2 d' <i>E. coli</i>	R2 V	M2	MtbR2
Phénol (1 mM)	81	3	30	80
2,4,6- Triméthylphénol (0,1 mM)	87	34	37	85
Paracétamol (1 mM)	89	3	0	100
"    (0,1 mM)	100	32	46	100
Hydroxyurée (1 mM)	41	39	38	84
Phénylhydrazine (1 mM)	37	15	0	0
Resvératrol (0,1 mM)	90	0	0	89
Furfuryl mercaptan (1 mM)	89	47	50	95
2-Thiophenethiol (1 mM)	66	0	0	46
"    (0,1 mM)		14	1	

**Tableau B-4** : Comparaison de la réactivité du radical tyrosinyle des protéines R2 d'*E. coli*, R2 d'*A. thaliana* (R2V), R2 de souris (M2) et R2 de *M. tuberculosis* (MtbR2). Les valeurs du tableau (valeurs corrigées en tenant compte des pertes de radicaux dans R2V et M2) représentent les pourcentages de radical tyrosinyle restant après 10 min d'incubation à 37°C des protéines en présence de réducteur. Fréquence : 9,41 GHz ; modulation d'amplitude : 3,12 G ; Puissance : 10 mW pour R2 d'*E. coli* et R2V, 20 mW pour M2 et 0,3 mW pour MtbR2.

L'analyse de ces résultats permet de faire plusieurs constatations :

- Le radical tyrosinyle des deux procaryotes (*E. coli*, *M. tuberculosis*) est moins sensible vis à vis des molécules testées que celui des eucaryotes (souris et *A. thaliana*). Les protéines R2 d'*E. coli* et MtbR2 bien qu'appartenant à des sous-classes différentes, respectivement la sous-classe Ia et la sous-classe Ib, présentent des réactivités comparables sauf pour la phénylhydrazine et l'hydroxyurée. Il faut noter que les différences de base entre ces deux sous-classes se trouvent principalement au niveau de la protéine R1 (perte de 50 acides aminés dans la partie N-terminale, mécanisme de régulation allostérique).

- On remarque une résistance de la protéine MtbR2 à l'hydroxyurée pendant que les autres protéines R2 (*E. coli*, *A. thaliana* et souris) ont la même sensibilité vis à vis de cet agent réducteur. D'une façon générale, le radical

## PARTIE B

---

tyrosinyle de MtbR2 ne présente pas une grande réactivité vis à vis des molécules chimiques testées ici (sauf pour la phénylhydrazine).

□ Les protéines R2 de souris et d'*A. thaliana* qui ont pratiquement la même réactivité présentent une grande sensibilité vis à vis de trois des molécules testées : le paracétamol, le resvératrol et le 2-thiophenethiol. Ces molécules chimiques réduisent sélectivement le radical tyrosinyle des protéines R2 de souris et d'*A. thaliana*.

### III-Conclusion.

Le radical tyrosinyle de la protéine R2 de *M. tuberculosis* a montré une grande résistance vis à vis des piègeurs de radicaux. Cette faible réactivité de MtbR2 peut s'expliquer par une protection stéréo électronique particulière du radical tyrosinyle qui le préserve des agents réducteurs. La sous-unité R2 de *M. tuberculosis* ne constitue pas une cible de choix pour la mise au point d'agents anti-tuberculeux. Par contre le resvératrol, le 2-thiophenethiol et le paracétamol présentent une réactivité particulière vis à vis des protéines R2 de souris et d'*A. thaliana*, indiquant des propriétés anti-prolifératives sélectives. C'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude en nous intéressant de plus près à la réactivité de ces molécules.

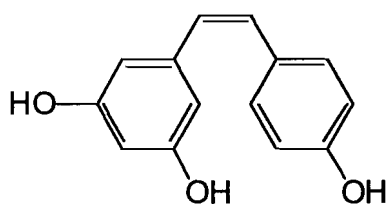
**Chapitre III : Le resvératrol, nouvel inhibiteur  
de la RNR de mammifères et de  
plantes.**

## **PARTIE B**

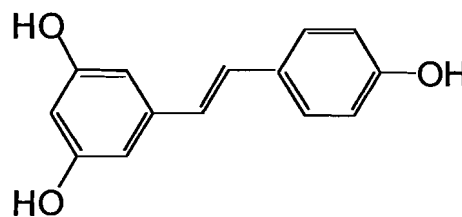
---

### I- INTRODUCTION

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxyxystilbène) est un composé apparenté à la famille des glucosides. Ces composés existent dans une configuration cis ou trans dans une série de spermatophytes (Gorham, 1980) dont les vignes, les arachides et les pins sont les principaux représentants.



Cis-resvératrol



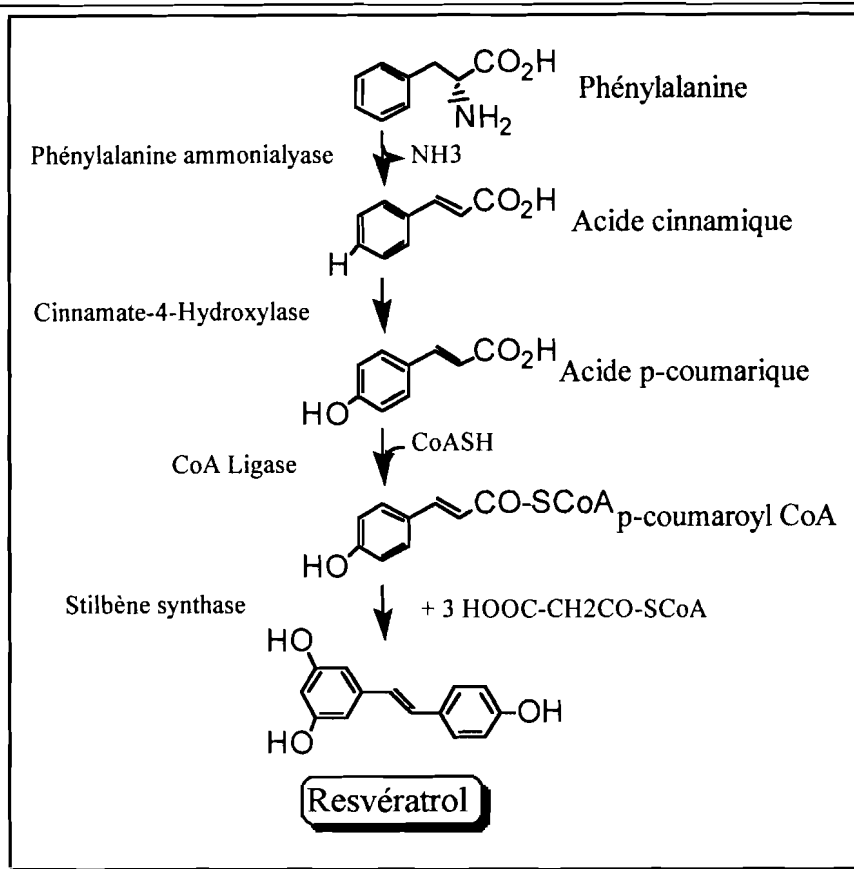
Trans-resvératrol

**Figure B-III-1:** Structures chimiques des isomères du resvératrol

C'est une phytoalexine anti-fongique conférant aux plantes une résistance à certaines maladies (Soleas et al., 1997). Dans le monde végétal, sa synthèse est induite par le stress, une infection ou par une irradiation UV. La structure squelettique essentielle du resvératrol est composée de deux noyaux aromatiques, liés par une double liaison. Les précurseurs immédiats du resvératrol sont le malonyl CoA et le coumaroyl CoA. Ce dernier provient de la phénylalanine, laquelle dans les plantes peut être synthétisée à partir des sucres (Hardina et al., 1985).



## PARTIE B



**Figure B-III-2:** voie de biosynthèse resvératrol à partir de la phénylalanine (Jeandet et al. 1995).

Dans la figure B-III-2, est illustrée la biosynthèse du resvératrol à partir de la phénylalanine. En perdant son groupement amino par désamination oxydative, catalysée par une enzyme spécifique, la phénylalanine ammonialyase, la phénylalanine est convertie en acide cinnamique, lequel est ensuite hydroxylé en acide p-coumarique. Dans l'étape suivante, le p-coumaroyl CoA est formé à partir d'un co-enzyme libre et d'une CoA ligase spécifique. La condensation du p-coumaroyl CoA avec trois molécules de malonyl CoA est effectuée grâce à l'activité de la stilbène synthase, et quatre molécules de CO<sub>2</sub> sont éliminées, pour chaque molécule de resvératrol synthétisée.

Au laboratoire, sa synthèse peut se faire par une réaction de Wittig, en liant deux substituants phénoliques appropriés à travers une double liaison styrène comme cela a été décrit par Moreno-Mana et Pleixats, 1985, et modifiée par d'autres (Jeandet et al., 1991, Goldberg et al., 1994). Dans cette stratégie, des précurseurs méthylés sont utilisés pour protéger les groupements hydroxyles,

## PARTIE B

---

lesquels sont éliminés par le tribromure de bore, avec formation de l'isomère trans, qui est le seul isomère naturel du resvératrol.

On portait très peu d'intérêt au resvératrol en ce qui concerne la biochimie des mammifères ou la science clinique. C'est en 1992 que Siemann et Greasy ont rapporté la présence du trans-resvératrol dans le vin, et ont attiré l'attention sur le fait qu'il était aussi un constituant de nombreux médicaments orientaux, réputés bénéfiques aux personnes souffrant de maladies telles que les affections du foie, de la peau, du cœur, de la circulation sanguine ou du métabolisme des lipides (Nonomura et al., 1963; Kubo et al., 1981). Il faut encore souligner, que le resvératrol fait partie du régime alimentaire de l'homme puisqu'on le retrouve non seulement dans le vin, mais aussi dans les arachides, certains fruits (mûres, raisins...) etc.

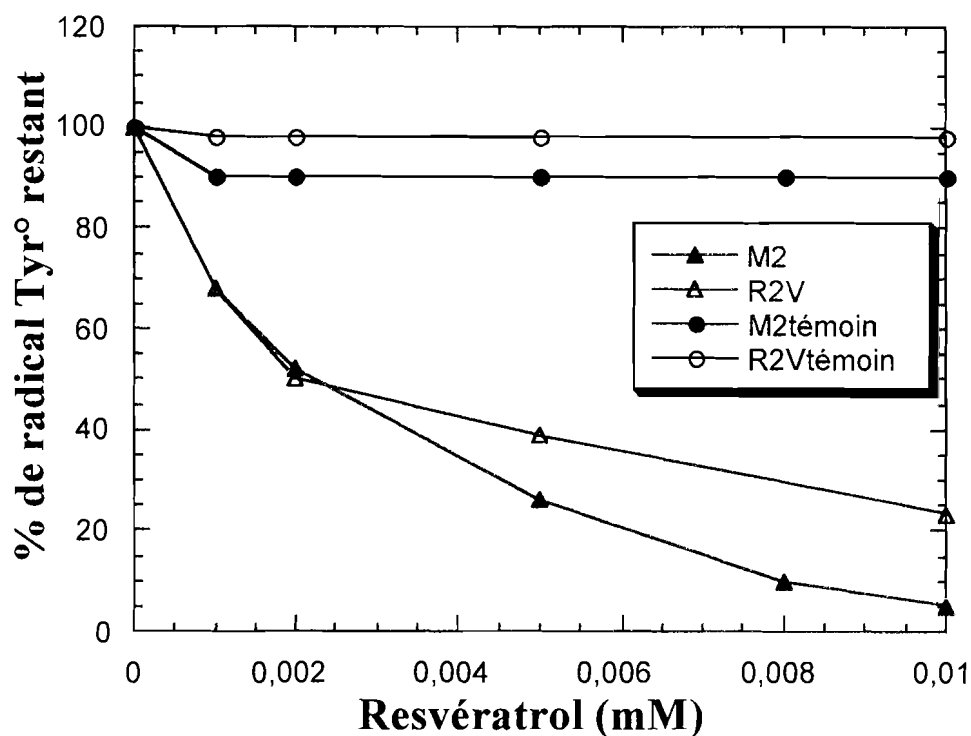
Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que le resvératrol, par son activité anti-oxydante, possédait de nombreuses fonctions biologiques telles que la protection contre les maladies cardiovasculaires (Stampfer et al., 1995), la modulation de la synthèse lipidique (Zannis et al., 1981; Hahn et al., 1992), l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Seigneur et al. 1990). Il a également une activité anti-mutagène (Sharma et al., 1994) et de nombreuses autres.

Récemment, Jang et collaborateurs (1997) ont montré que le resvératrol pouvait également inhiber certains phénomènes cellulaires tels que la formation et la progression des tumeurs et de ce fait se plaçait comme un agent anti-cancéreux potentiel et intéressant étant donné sa faible toxicité. Peu de choses sont connues sur son mode d'action. En tant que polyphénol, le resvératrol est un piègeur de radicaux capable d'inhiber par exemple l'activité de la cyclooxygénase (Jang et al., 1997). C'est pourquoi nous avons voulu tester sa réactivité vis à vis de la ribonucléotide réductase, et ceci à trois niveaux : sur la protéine R2 pure de souris et *d'Arabidopsis thaliana*, où nous avons regardé sa réactivité vis à vis du radical tyrosinyle, sur l'activité ribonucléotide réductase, et sur la croissance de deux lignées de cellules tumorales, l'une humaine (K-562) et l'autre de souris (P-815) en collaboration avec M. Lepoivre (Orsay). Sa réactivité vis à vis de la croissance de cellules végétales a également été examinée.

### II- RESULTATS

#### II-1- Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 d'*A. thaliana* et R2 de souris par le resvératrol.

On fait réagir les protéines R2 de souris (10  $\mu\text{M}$ ) et R2 d' *A.thaliana* (10  $\mu\text{M}$ ), avec des concentrations croissantes en resvératrol. Les expériences sont analysées en spectroscopie RPE à 100K (cf. Matériels et Méthodes paragraphe III-8), en visualisant la diminution d'amplitude du signal centré à  $g = 2.00$ , caractéristique du radical tyrosinyle qui indique une inactivation de la protéine R2. Pour chaque concentration testée, le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5 minutes. Dans la figure B-III-3, est représenté le pourcentage de radical tyrosinyle restant en fonction de la concentration en inhibiteur. Les valeurs obtenues pour le resvératrol ont été comparées à celles obtenues lors de la réduction de ces mêmes protéines par l'hydroxyurée.



**Figure B-III-3:** Inactivation des protéines R2 de la ribonucléotide réductase d'*A. thaliana* (en bleu) et de souris (en rouge), par des concentrations croissantes de resvératrol (triangles) et d'hydroxyurée (ronds). 10  $\mu\text{M}$  de protéines R2 de souris et d'*A. thaliana* sont incubées à 37°C, pendant 5 min, en présence du réducteur.

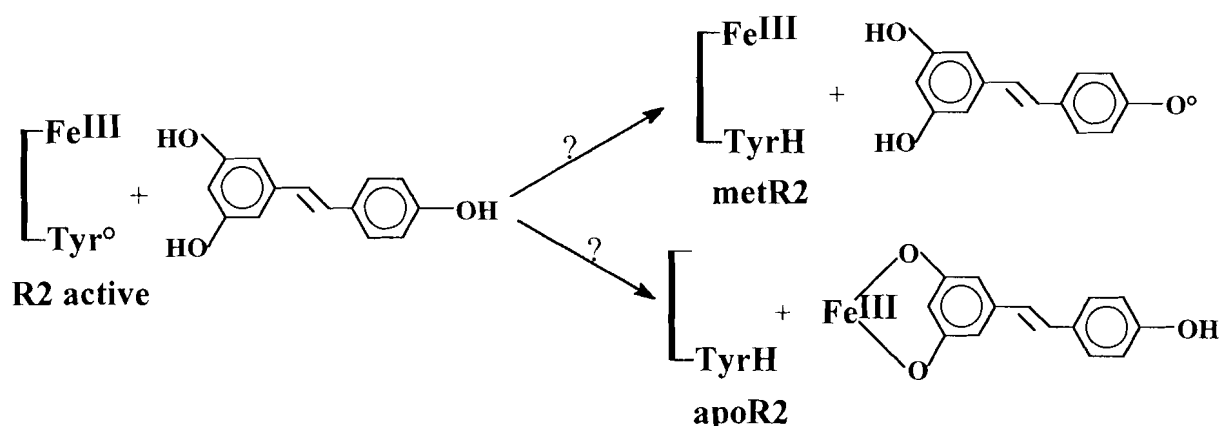
Les résultats de la figure B-III-3, montrent que:

- Les protéines R2 de souris et d'*A. thaliana* présentent des réactivités très semblables vis à vis des 2 types d'inhibiteurs.
- Le resvératrol est très efficace contre le radical tyrosinyle de la protéine R2 de ces deux espèces. Cette réaction d'inactivation est pratiquement stoechiométrique ; 10  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur inactive 10  $\mu\text{M}$  de protéine, alors que l'effet de l'hydroxyurée est pratiquement négligeable sur les deux protéines à ces concentrations. Des doses plus importantes sont requises pour la réduction du radical tyrosinyle par l'hydroxyurée.

Nous avons évoqué dans l'introduction générale la possibilité d'une inhibition de la ribonucléotide réductase par chélation du fer de la protéine R2 par

## PARTIE B

certains polyphénols tels que le catéchol ou les acides hydroxamiques. Le resvératrol, possédant un groupement ortho-dihydroxyle capable de complexer le fer de la protéine R2, on peut supposer que l'inactivation de R2 par cette molécule se fasse également au niveau du centre ferrique. Dans ce cas, la disparition observée du radical tyrosinyle serait une conséquence de la chélation du fer. Dans le schéma A-1, nous proposons les différents mécanismes possibles d'inactivation de la protéine R2 par le resvératrol.



**Schéma A-1** : Mécanisme proposé pour l'inactivation de la protéine R2 de souris par le resvératrol.

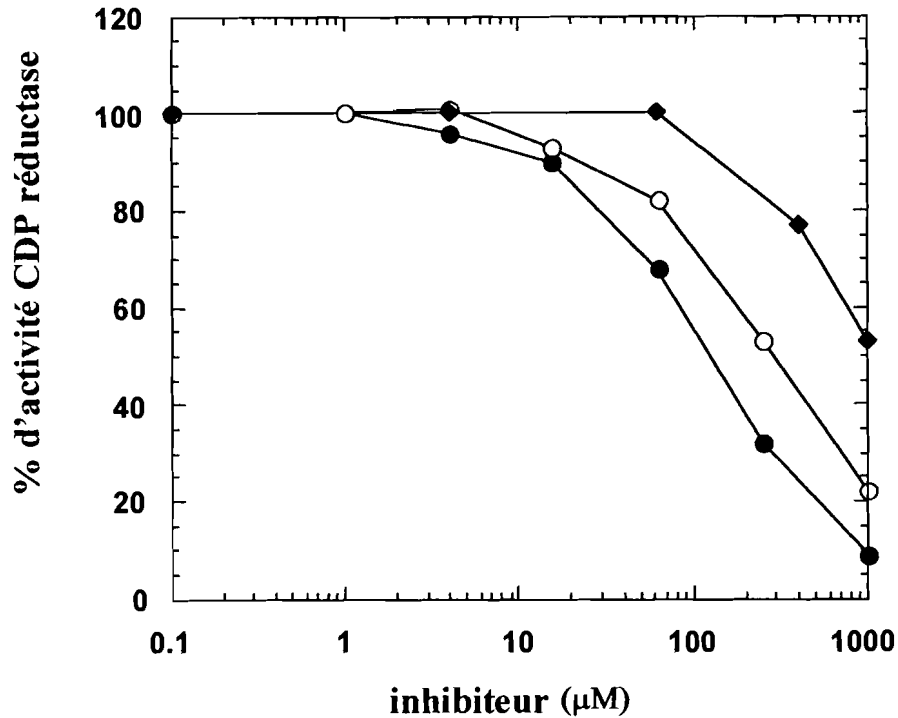
Des expériences de réduction de la protéine R2 de souris par le resvératrol en anaérobiose et caractérisées en spectroscopie UV-visible devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'inactivation. En effet, on pourrait ainsi analyser si le centre ferrique est touché par le resvératrol. Et si c'était le cas, on devrait observer une diminution des bandes d'absorption du site métallique (370 nm et 325 nm) parallèlement à la baisse du pic d'absorption du radical tyrosinyle.

### **II-2- Inhibition de l'activité ribonucléotide réductase par le resvératrol.**

La capacité du resvératrol à réduire le radical tyrosinyle de la protéine R2 est corrélée à son effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la ribonucléotide réductase.

Les tests ont été réalisés par l'équipe du Dr Lepoivre à Orsay sur des extraits solubles de cellules leucémiques de souris L-1210, possédant une bonne surexpression de la protéine R2 et une forte activité cytidine diphosphate réductase. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 dans lequel on a rajouté des antibiotiques, 5 % de sérum de fœtus de veau inactivé par la chaleur (Gibco BRL SARL, Cergy-pontoise, France), et dans du tampon HEPES 25 mM pH=7,4. Les cellules sont centrifugées en phase exponentielle de croissance, lavées avec du tampon phosphate, et resuspendues dans du tampon HEPES 100 mM pH=7,6, 15 mM d'acétate de magnésium et 10 mM de DTT, à une concentration de  $2.10^8$  cellules/ml. La préparation des extraits cellulaires et le test d'activité réductase ont été réalisés comme cela a été décrit par Lepoivre et al. 1990. Les inhibiteurs sont ajoutés avec le substrat quand cela est requis.

La figure B-III-4, illustre le résultat des tests effectués en présence de trois inhibiteurs : le resvératrol, l'hydroxyurée et le p-propoxyphénol, molécule présentée comme étant l'un des meilleurs inhibiteurs phénoliques de la RNR. Les courbes représentent le pourcentage d'activité CDP réductase calculé en fonction de concentrations croissantes en inhibiteur. 100% d'activité correspondent à l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur.



**Figure B-III-4** : Inhibition de l'activité ribonucléotide réductase de souris par le resvératrol (●), l'hydroxyurée (◆) et le p-propoxyphénol (○). 100% d'activité correspond à 100 pmol/min/mg dans les tests avec le resvératrol et le p-propoxyphénol, et à 22 pmol/min/mg dans le test de l'hydroxyurée.

L'observation de ces courbes montre que le resvératrol inhibe plus efficacement la RNR de souris que le p-propoxyphénol ou l'hydroxyurée. Les valeurs d' $IC_{50}$  qui représentent les concentrations nécessaires pour une inhibition de 50 % de l'activité réductase, sont de 100 μM, 300 μM et 1000 μM respectivement pour le resvératrol, le p-propoxy et l'hydroxyurée. On peut supposer que dans des cellules normales, où on a une quantité de protéines R2 limitée, les valeurs du  $IC_{50}$  soient beaucoup plus faibles.

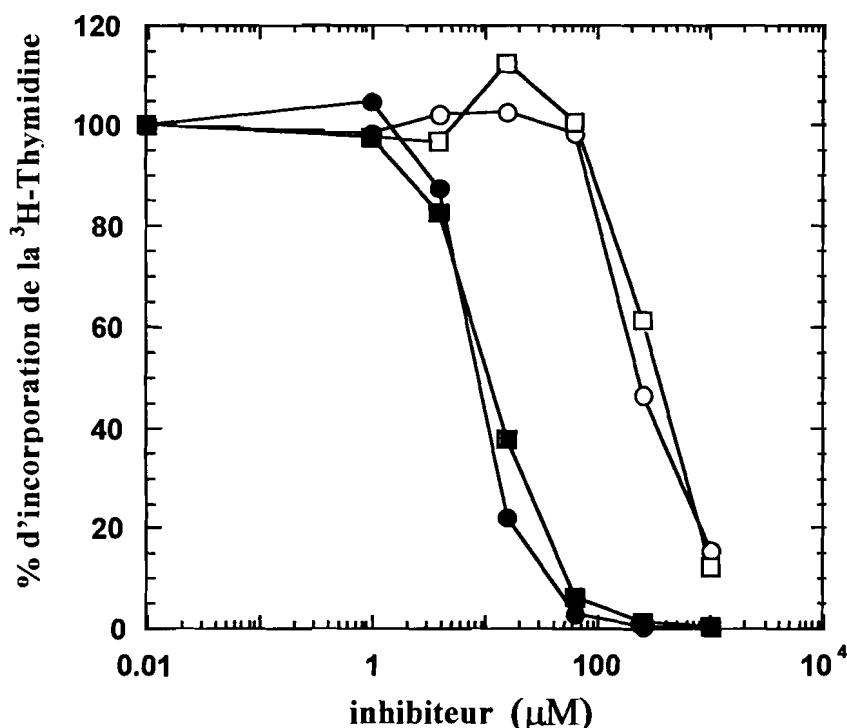
### II-3 Inhibition de la synthèse d'ADN par le resvératrol.

Les propriétés anti-prolifératives et l'effet inhibiteur du resvératrol sur la biosynthèse de l'ADN peuvent être évaluées à partir de l'incorporation de la  $^3H$ -

## PARTIE B

thymidine dans l'ADN. Les tests, effectués par l'équipe du Docteur Lepoivre à Orsay, ont été réalisés sur des cellules mastocytoplasmiques P-815 de souris, et sur des cellules leucémiques myélogéniques K-562 humaines. Ces cellules sont ensemencées dans 96 puits d'une plaque de micro-culture ( $10^5$  cellules/puit) dans 100  $\mu$ l de milieu de culture.

Les cellules mises en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur sont incubées à 37°C pendant 24h avec de la  $^3\text{H}$ -thymidine (activité spécifique 37 Gbq/mol ; Amersham, France). L'ADN est récupéré et la radioactivité est ensuite mesurée et comparée au contrôle sans inhibiteur (100%). Là aussi nous avons comparé les résultats obtenus avec le resvératrol à ceux obtenus avec l'inhibiteur de référence, i.e. l'hydroxyurée.



**Figure B-III-5** : Inhibition de la synthèse d'ADN par le resvératrol et l'hydroxyurée. Les cellules tumorales K-562 (ronds) et P-815 (carrés) ont été incubées avec du resvératrol (symboles noirs) ou l'hydroxyurée (symboles clairs) et  $^3\text{H}$ -thymidine à 37°C pendant 24 heures.



## PARTIE B

---

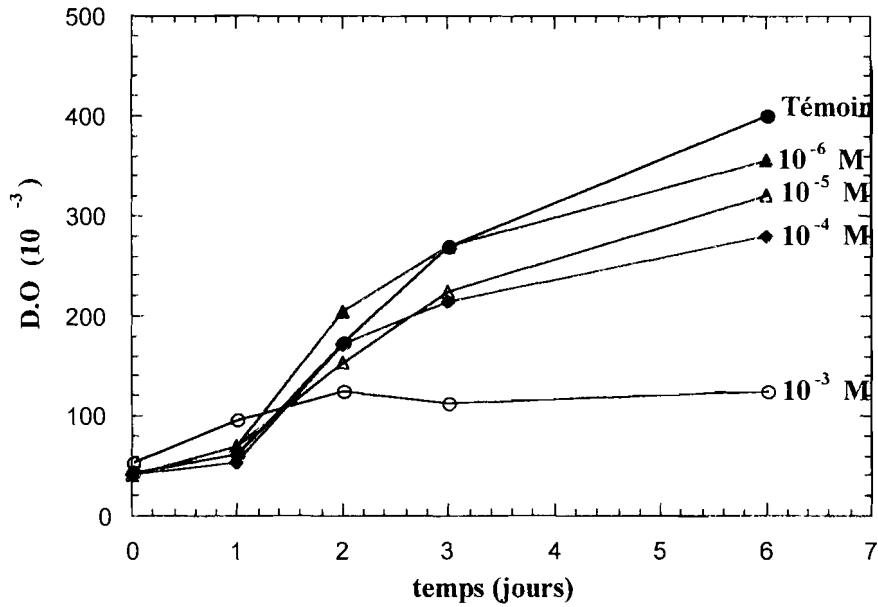
Les deux lignées cellulaires donnent des résultats comparables que ce soit avec le resvératrol ou l'hydroxyurée. Les courbes de la figure B-III-5, montrent que le resvératrol est un meilleur inhibiteur de la biosynthèse d'ADN, avec un  $IC_{50}$  de 8 à 10  $\mu$ M, que l'hydroxyurée. Ce dernier est 200 fois moins efficace, avec un  $IC_{50}$  de 250  $\mu$ M. Ces valeurs sont toutefois plus faibles que celles obtenues dans l'expérience précédente, puisque ici on n'a pas une forte surexpression de la protéine R2 par les cellules.

### **II-4 Inhibition de la croissance cellulaire d'*A. thaliana* par le resvératrol.**

L'effet du resvératrol et de l'hydroxyurée sur la croissance cellulaire a également été examiné sur des cellules de plantes (*A. thaliana*). Les expériences ont été réalisées en collaboration avec Jean-Pierre Laulhère (cbcrb-DBMS, ceng, CEA grenoble) selon le protocole décrit dans la partie "Matériels et Méthodes" paragraphe III-13. Des échantillons de culture cellulaire sont mis en culture dans les puits d'une plaque de culture stérile (Nunc). Puis des concentrations croissantes en resvératrol ou en hydroxyurée sont ajoutées dans les différents puits, contenant les cellules végétales, et des mesures densimétriques sont faites quotidiennement pour caractériser la croissance cellulaire.

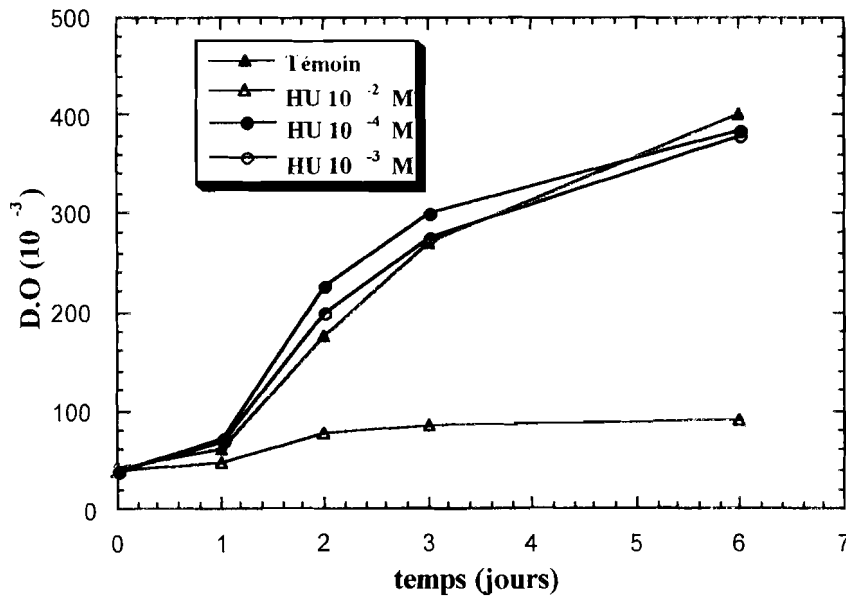
Le resvératrol étant insoluble dans l'eau, nous l'avons dissout dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO). Des puits témoins contenant uniquement la culture cellulaire ont donc été préparés avec des quantités de DMSO équivalentes à celles ajoutées pour le resvératrol. Les résultats obtenus avec le resvératrol et l'hydroxyurée sont illustrés dans les figures B-III-6 et B-III-7. Les courbes de croissance cellulaire en fonction du temps sont tracées pour différentes concentrations d'inhibiteur.

## PARTIE B



**Figure B-III-6:** Inhibition de la croissance cellulaire par le resvératrol.

Des cellules *A. thaliana* sont incubées avec des concentrations croissantes de resvératrol à 25°C.



**Figure B-III-7 :** Inhibition de la croissance cellulaire par HU.

Des cellules *A. thaliana* sont incubées avec des concentrations croissantes de HU à 25°C.

## PARTIE B

Les figures B-III-6 et B-III-7, montrent qu'aussi bien pour le resvératrol que pour l'hydroxyurée, un seuil de concentration est nécessaire pour qu'il y ait un effet inhibiteur des drogues sur la croissance cellulaire. Jusqu'à une concentration de  $10^{-5}$  M, le resvératrol n'a pas d'effet sur cette croissance. L'inhibition est partielle à  $10^{-4}$  M et totale à partir de  $10^{-3}$  M. L'hydroxyurée est moins efficace puisque jusqu'à une concentration de  $10^{-3}$  M il ne se passe rien. Il faut une concentration 10 fois supérieure pour une inhibition totale de la croissance cellulaire.

### III- Discussion.

Le resvératrol a énormément intrigué les scientifiques ces dernières années, suite aux révélations concernant son potentiel thérapeutique et quelquefois basées sur des considérations empiriques : c'est un ingrédient majeur de la médecine traditionnelle chinoise et japonaise (Noromura et al., 1963 ; Kubo et al., 1981). A travers ces résultats, nous venons de découvrir pour la première fois que le resvératrol est un remarquable inhibiteur de la ribonucléotide réductase de mammifères mais aussi des plantes.

Le resvératrol inhibe efficacement la synthèse de l'ADN. Ces propriétés anti-prolifératives du resvératrol sont du moins corrélées à l'inactivation de la ribonucléotide réductase. En effet, nous avons montré que l'activité ribonucléotide réductase était fortement inhibée par le resvératrol, et d'autre part que cet effet était certainement dû au piégeage du radical tyrosinyle de la protéine R2 de l'enzyme.

Nous avons également démontré que le resvératrol était beaucoup plus efficace que l'hydroxyurée ou encore que le p-propoxyphénol désigné comme le meilleur inhibiteur phénolique de la RNR. Des inhibiteurs aussi efficaces, comme les p-alkoxyphénols (Pötsh et al., 1995) ont une toxicité trop élevée pour être utilisés en clinique comme agent anti-tumoral. L'hydroxyurée également présente de forts effets toxiques secondaires. Le resvératrol, en tant que produit naturel intervenant dans l'alimentation de l'homme et certainement moins toxique, pourrait être une alternative à l'hydroxyurée dans le cadre d'une chimiothérapie.

## PARTIE B

---

Les expériences in vitro et in vivo sur les potentialités du resvératrol ne sont pas définitives, et d'autres études cliniques devront permettre de mieux comprendre tous les effets biologiques de cette molécule, y compris une approche bithérapeutique contre le V.I.H. Pour l'heure, ces résultats indiquent que le resvératrol peut constituer une alternative crédible, en tant qu'agent chimiopréventif du cancer chez l'homme.

## PARTIE B

---

**Chapitre IV: Les composés thiols aromatiques,  
une nouvelle classe d'inhibiteur de  
la ribonucléotide réductase.**

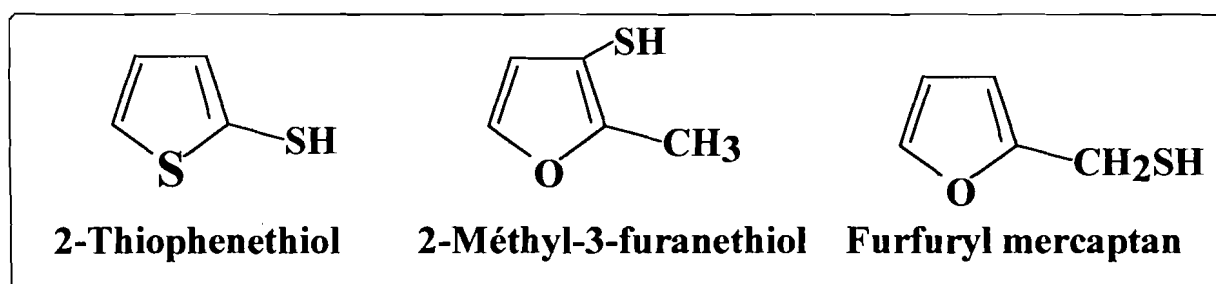
## **PARTIE B**

---

## I- Introduction

Les thiols sont supposés jouer un rôle majeur dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides. Des composés soufrés tels que la glutathion,  $\alpha$ -mercaptopropionyl-glycine, et le N-acétyl cystéine sont capables d'inhiber la peroxydation de l'acide arachidonique, induite par la réaction de la méthémoglobine (MetMb) avec  $H_2O_2$  (Mitsos et al., 1998; Kanner et Harel, 1985).

Récemment, plusieurs composés thiols hétéroaromatiques, tels que le 2-thiophenethiol, le 2-méthyl-3-furanethiol, et le furfuryl mercaptan ont montré d'intéressantes activités anti-oxydantes (Eiserich et Shibamoto, 1994). En effet Eiserich a démontré que ces composés étaient capables de réduire des radicaux tyrosinyles formés à partir de la tyrosine, en solution aqueuse, avec une activité similaire à celle de l'acide ascorbique. Nous avons alors décidé de tester la réactivité de ces molécules soufrées, sur le radical tyrosinyle de la protéine R2 de la RNR. Ainsi, dans cette étude, les activités anti-oxydantes du 2-thiophenethiol, du 2-méthyl-3-furanethiol et du furfuryl mercaptan, sont mesurées en observant l'inactivation des protéines R2 d'*E. coli*, de souris, et d'*A. thaliana* par réduction du radical tyrosinyle. Les structures de ces molécules sont illustrées dans la figure B-IV-1.



**Figure B-IV-1** : Structures du 2-thiophenethiol, du 2-méthyl-3-furanethiol et du furfuryl mercaptan.



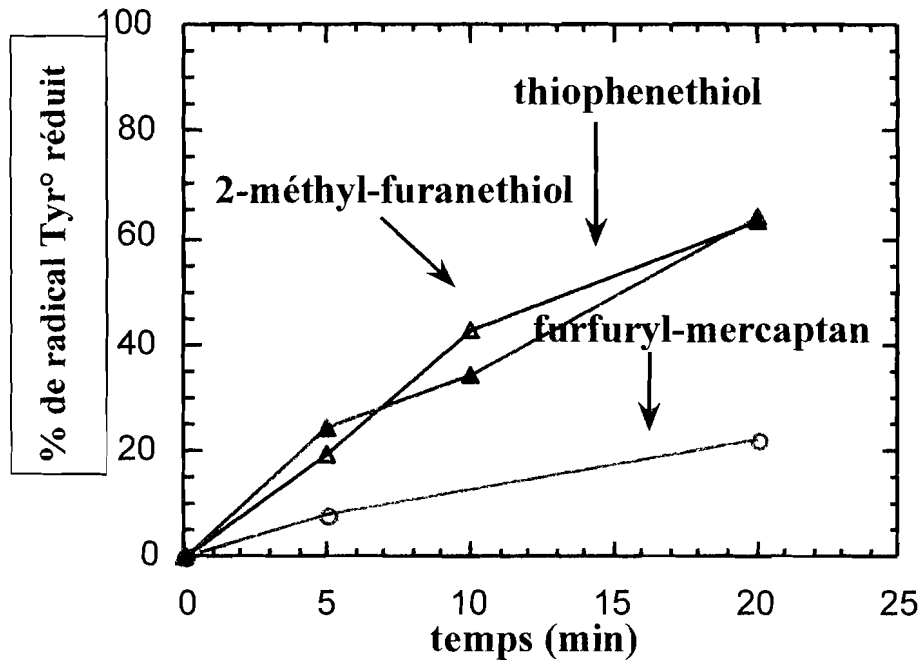
### II- Résultats

#### II-1 Réduction de la protéine R2 d'*E. coli* par le 2-thiophenethiol, le 2-méthyl-3-furanethiol et le furfuryl mercaptan.

La réactivité du radical tyrosinyle de la protéine R2 pure d'*E. coli* est testée vis à vis du 2-thiophenethiol (1 mM), du 2-méthyl-3-furanethiol (1 mM) et du furfuryl mercaptan (1 mM). Les expériences sont réalisées en spectroscopie RPE à 100K, en observant la diminution d'amplitude du signal centré à  $g=2,00$  caractéristique du radical tyrosinyle. Les réducteurs soufrés sont préparés dans du DMSO. Un tube témoin (courbe non présentée) de la protéine R2 incubée avec 2 à 4  $\mu\text{l}$  de DMSO, montre que ce dernier n'a pas d'effet sur le radical tyrosinyle de R2 d'*E. coli* dans les temps de réaction utilisés.

Les courbes de la figure B-IV-2, représentent les pourcentages de radical tyrosinyle réduit en fonction du temps pour des préparations protéiques de R2 (11  $\mu\text{M}$ ) incubées à 37°C en présence de réducteur (1 mM).

## PARTIE B



**Figure B-IV-2 :** Réduction en fonction du temps du radical tyrosinyle de la protéine R2 (11  $\mu$ M) par le 2-thiophenethiol (1 mM) (▲), le 2-méthyl-3-furanethiol (1 mM) (Δ) et le furfuryl mercaptan (1 mM) (○). La protéine R2 est incubée à 37°C en présence de réducteur.

Le 2-thiophenethiol, le 2-méthyl-3-furanethiol et le furfuryl mercaptan à 1 mM présentent une activité anti-oxydante, en réduisant respectivement 60 %, 60 % et 20 % du radical tyrosinyle de la protéine R2 d'*E. coli* après 20 min d'incubation à 37°C. Nous venons de montrer, et cela pour la première fois que des composés soufrés étaient capables de réduire efficacement le radical tyrosinyle de la sous-unité R2 de la RNR. Les thiols aromatiques, le 2-thiophenethiol et le 2-méthyl-3-furanethiol, sont beaucoup plus efficaces que le thiol aliphatique qu'est le furfuryl mercaptan. L'attachement direct du groupement thiol sur le noyau aromatique permet une réduction plus efficace du radical tyrosinyle.

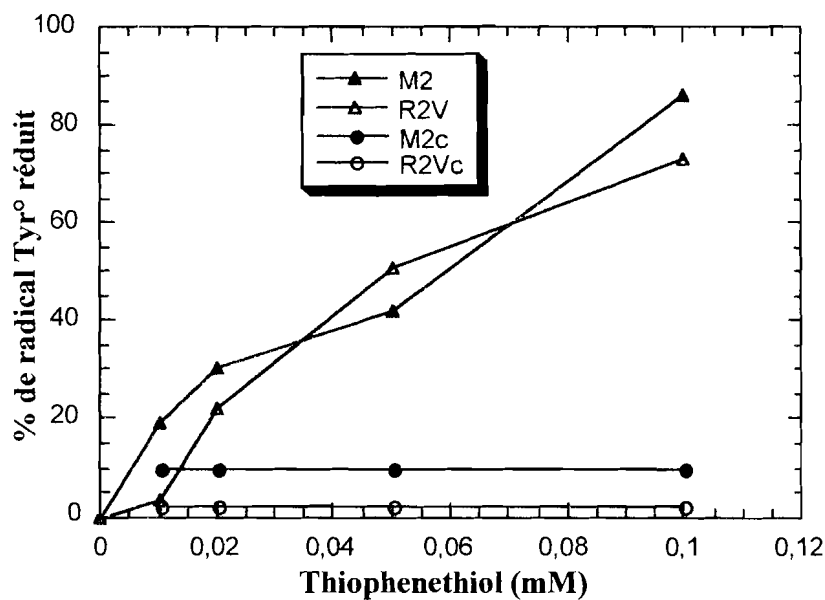
### II-2. Réduction des protéines R2 de souris et R2 d'*A thaliana* par le 2-thiophenethiol.

Les expériences sont réalisées sur des préparations protéiques de R2 de souris (15  $\mu$ M) et R2 d'*A thaliana* (10  $\mu$ M). Les courbes de la figure B-IV-3 représentent les pourcentages de radical tyrosinyle réduit, en fonction de

## PARTIE B

concentrations croissantes en 2-thiophenethiol. Pour chacune des concentrations testées, le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5 minutes.

Le 2-thiophenethiol, tout comme le furfuryl mercaptan, est insoluble dans l'eau. Les solutions de réducteurs sont donc préparées à partir du DMSO. Un tube témoin de la protéine sans le réducteur, mais en rajoutant uniquement du DMSO (le même volume que celui des tests d'inactivation), est alors réalisé. Le tube témoin est également incubé à 37°C pendant 5 min. La réduction du radical tyrosinyle est caractérisée en spectroscopie RPE à 100K en suivant la diminution d'amplitude du signal centré à  $g=2,00$ .



**Figure B-IV-3 :** Réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 de souris (▲) et R2 d'*A. thaliana* (△) par des concentrations croissantes de 2-thiophenethiol. Les deux protéines sont incubées à 37°C, pendant 5 minutes, avec le 2-thiophenethiol. (●) contrôle avec R2 de souris, sans réducteur ; (○) contrôle avec R2 d'*A. thaliana* sans réducteur.

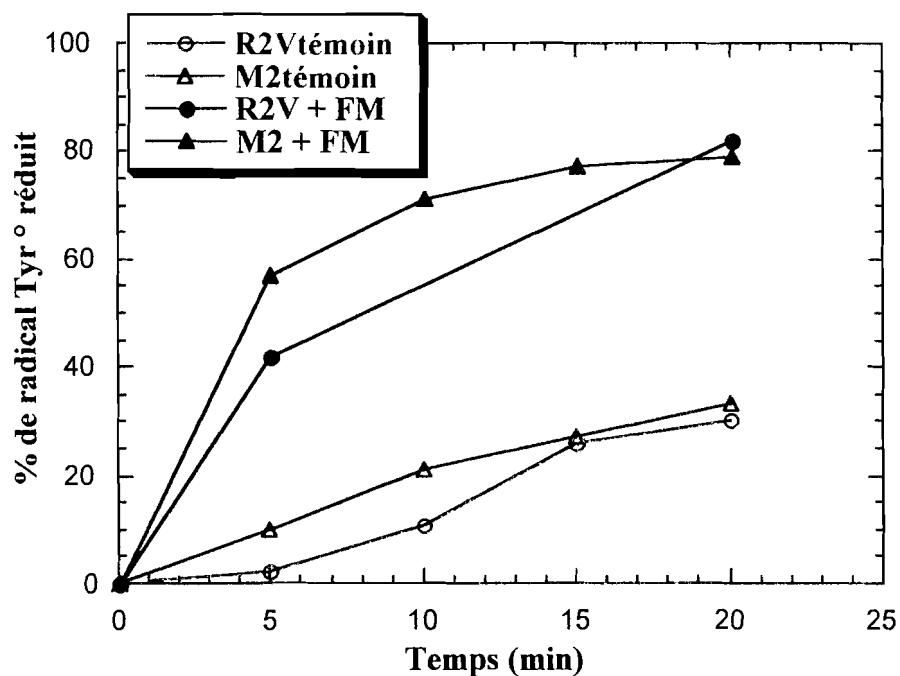
Les résultats de la figure B-IV-3, montrent que les deux protéines R2, de souris et d'*A.thaliana* ont la même réactivité vis à vis du 2-thiophenethiol. L'effet du 2-thiophenethiol sur deux protéines est relativement important : à une concentration de 0.1 mM, ce dernier inactive plus de 80% des protéines après 5

## PARTIE B

min d'incubation. Les contrôles effectués sur les protéines R2 de souris et d'*A. thaliana* indiquent qu'après 5 min d'incubation à 37°C avec le DMSO, ces protéines perdent respectivement 10 % et 2 % seulement de leur teneur en radical.

### II-3 Réduction des protéines R2 de souris et R2 d'*A. thaliana* par le furfuryl mercaptan.

On suit en fonction du temps, la réduction du radical tyrosinyle des protéines R2 de souris (15  $\mu$ M) et d'*A. thaliana* (10  $\mu$ M) incubées à 37°C, en présence de furfuryl mercaptan à une concentration de 1 mM. La réduction du radical tyrosinyle est caractérisée en spectroscopie RPE à 100K en suivant la diminution d'amplitude du signal centré à  $g = 2.00$ .



**Figure B-IV-4** : réduction en fonction du temps du radical tyrosinyle des protéines R2 de souris (●) et R2 d'*A. thaliana* (▲) par le furfuryl mercaptan (0.1 mM). Les deux protéines sont incubées, à 37°C, avec le réducteur (◻) contrôle avec R2 de souris, sans réducteur, (○) contrôle avec R2 d'*A. thaliana*, sans réducteur.

Les courbes de la figure B-IV-4, montrent que le furfuryl mercaptan (1 mM) est capable de piéger efficacement le radical tyrosinyle de R2. Lorsqu'on compare le furfuryl mercaptan au 2-thiophenethiol, on se rend compte que ce dernier est plus efficace. En effet, le 2-thiophenethiol (0.1 mM) réduit environ 80% de radical tyrosinyle en 5 minutes, alors que le furfuryl mercaptan avec une concentration 10 fois supérieure, réduit à peine la moitié. Les tubes témoins réalisés sur les protéines M2 et R2V incubées uniquement avec du DMSO, indiquent une baisse relativement importante de la teneur en radical tyrosinyle avec le temps.

Le caractère aromatique du 2-thiophenethiol est important pour la réduction du radical tyrosinyle. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà rapportés. Le transfert d'un électron d'un thiol aromatique vers un centre radicalaire oxygéné, tel que le radical tyrosinyle est plus favorable thermodynamiquement par rapport à un thiol aliphatique (Holler et Hopkins, 1989). La supériorité du 2-thiophenethiol, comparée au thiol aliphatique, qu'est le furfuryl mercaptan est aussi due à sa capacité de former un radical aromatique stable (délocalisé) par rapport au radical thiyle aliphatique.

### III- Conclusion

Comme dans le cas du resvératrol, ces résultats montrent que le 2-thiophenethiol et le furfuryl mercaptan peuvent être des inhibiteurs efficaces de la ribonucléotide réductase des mammifères et des plantes, même si le resvératrol présente un pouvoir inhibiteur plus grand de l'ordre du micromolaire.

La réduction du centre radicalaire de la protéine R2, peut s'expliquer par un mécanisme anti-oxydatif des molécules thiols étudiées. Le groupement thiol réduit donc efficacement le radical tyrosinyle de la protéine R2. D'autres études sur l'activité de l'holoenzyme ou sur des cellules devront permettre de confirmer ces résultats.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

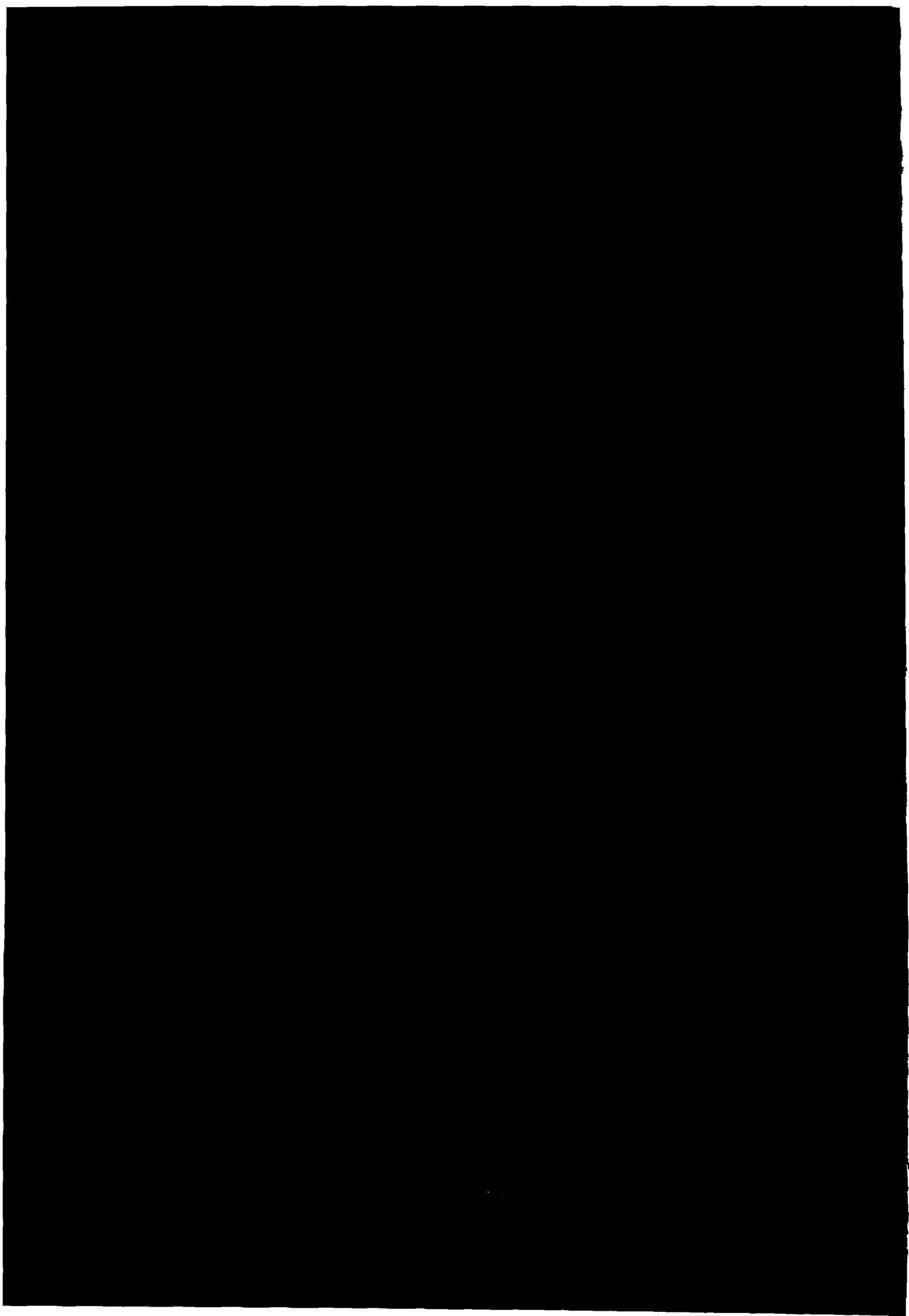
...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...



Les ribonucléotides réductases catalysent la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Elles jouent un rôle clef dans la régulation de la synthèse d'ADN et sont des cibles pour les molécules anti-prolifératives.

La synthèse de l'ADN dépend de la concentration des quatre désoxyribonucléotides que sont le dATP, le dTTP, le dGTP et le dCTP. Dans tous les organismes vivants, et sans exception jusqu'à présent, la formation des désoxyribonucléotides se fait par la réduction des ribonucléotides correspondants.

Dans les cellules vivantes une famille de métalloprotéines, les RNRs, catalyse cette réaction à travers une chimie radicalaire. En effet, les RNRs sont des enzymes uniques qui requièrent toutes une protéine radicalaire pour leur activité : la RNR à centre ferrique non héminique de classe I (mammifères, plantes, *E. coli*) utilise une paire de radicaux tyrosinyle/cystéinyle, la RNR adénosylcolbalamine de classe II (procaryotes, archa) un radical cystéinyle, et la RNR à centre fer soufre de classe III (organismes anaérobies facultatifs) un radical glycinyne.

La protéine R2 de la RNR de classe I d'*E. coli* possède deux cofacteurs, le radical tyrosinyle et un centre ferrique, qui sont enfouis à l'intérieur de la protéine à environ 10 Å de la surface la plus proche. L'analyse de la structure tridimensionnelle de cette protéine R2 a permis de mettre en évidence une voie d'accès (canal) aux centres redox de R2. L'étude de la réactivité de ce radical montre que ce dernier présente une réactivité particulière vis à vis d'un certain type d'agents réducteurs : les molécules chimiques possédant un groupement aromatique.

Durant cette thèse, nous avons montré que cette réactivité pouvait être modifiée par de légers changements stéréoélectroniques dans l'environnement proche du site radicalaire, par l'utilisation de la mutagenèse dirigée. Ces résultats laissent penser que la protéine R2 est assez flexible pour permettre le passage de petites molécules chimiques vers le site radicalaire. Néanmoins, le



mécanisme de réduction du radical tyrosinyle par un transfert d'électrons à longue distance ne peut être exclu. Ces études nous ont permis de mieux comprendre la relation structure réactivité de la protéine R2 sans toutefois apporter de réponses claires sur le mécanisme de réduction du radical tyrosinyle. Pour la poursuite de ce travail, la détermination de la structure cristallographique de chaque mutant semble primordiale. Elle permettrait en effet de confirmer ou d'infirmer les modifications stériques du canal, apportées par les mutations.

On peut également penser que dans la protéine R2 d'*E. coli* la réduction du radical tyrosinyle par les piègeurs de radicaux se fait par les deux mécanismes ; dans ce cas, le choix du mécanisme (transfert direct ou indirect) pourrait dépendre de la taille ou même de la charge de l'agent réducteur utilisé.

Depuis la découverte des RNRs dans les années 1960, un grand nombre d'informations a été obtenu au sujet de la chimie et de la biochimie de ces métalloprotéines. Les nouvelles frontières de ces études devraient nous amener à comprendre l'assemblage et le désassemblage de ces cofacteurs métalliques, le(s) mécanisme(s) de régulation allostérique qui gouverne la catalyse et surtout la réactivité de ces protéines radicalaires vis à vis de certains piègeurs de radicaux.

La possibilité d'inhibition de la ribonucléotide réductase, et par conséquent celle de la synthèse d'ADN fait de cette enzyme une cible importante pour les molécules anti-cancéreuses, anti-virales ou anti-bactériennes.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons purifié et caractérisé les protéines R2 de nouvelles RNRs de classe I, *M. tuberculosis* et *P. falciparum*. L'étude comparative de la réactivité du radical tyrosinyle des protéines R2 d'*E. coli*, de *M. tuberculosis*, d'*A. thaliana* et de souris a montré la possibilité d'une inhibition sélective très efficace de la RNR de ces organismes avec des composés tels que le resvératrol, une phytoalexine naturelle, ou des thiols aromatiques.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### A

Abbruzzese J. L., et al., and Plunkett W. (1991) *J. Clin. Oncol.* **9** : 491-498

Åberg A., Hahne S., Karlsson M. ;, Larsson A, Ormö M, Ahgren A. et al. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 12249-12252

Åberg A., Ormö M., Nordlund P., Sjöberg B.-M. (1993) *Biochemistry* **32** : 9845-9850

Allard P., Barra A. L., Andersson K. K., Schmidt P.P., Atta M. and Gräslund A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118** : 895-896

Atkin C. L., Thelander L., Reichard P. and Lang G. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248** : 7464-7472

Atta M, Lamarche N, Battioni JP, Massie B, Langelier Y, Mansuy D. and Fontecave M. (1993) *Biochemistry J* **290** : 807-810

Atta M., Nordlund P., Åberg A., Eklund H. and Fontecave M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** : 20682-20688

### B

Backes G., Sahlin M., Sjöberg B.-M., Loehr T. M. and Sanders-Loehr J. (1989). *Biochemistry*, **28**, : 1923-1929

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Baker C.H., Banzon J., Bollinger J.M., Stubbe J., Samano V., Robins M.J. , et al. (1991)**  
*J. Med. Chem.* **34**: 1879-1884

**Bender C. J., Sahlin M., Babcock G. T., Barry B. A., Chandrashekar T. K., Salowe S. P., Stubbe J., Lindström B., Petersson L., Ehrenberg A. and Sjöberg B.-M. (1989).** *J. Am. Chem. Soc.*, **111** : 8076-8083

**Bobrowski K., Wierzchowski K. L., Holcman J. and Ciurak K. (1990)** *Int. J. Radiat. Biol.* **57** : 919-932

**Bollinger JM, Tong WH, Ravi N, Huynh BH, Edmonson DE, Stubbe J (1994)** *J. Am. Chem. Soc.* **116** : 8015-8023

**Booker S., Licht S., Broderick J., Stubbe J. (1994)** *Biochemistry* **33** :12676-12685

**Bradford M.M. (1976)** *Anal Biochem.*, **72** : 248-254

**Bult Cj., White O., Olsen Gj., Zhou L., Fleischmann RD., Sutton GG., Blake JA., FitzGerald LM., Clayton RA., Goycayne JD., Kerlavage AR., Dougherty BA., Tomb JF., Adams MD., Reich CI., Overbeek R., Kirkness EF., Weinstock KG., Merrick JM., Glodeck A., Scott JL., Geoghagen NSM., Weidman JF., Furhmann JL., Venter JC et al. (1996)** *Science*, **273** : 1058-1073

**Burdi D., Sturgeon B. E., Tong W. H., Stubbe J. A.and Hoffman B. M. (1996)** *J Am. Chem. Soc.* **118** : 281-282

**Burghaus O., Plato M., Rohrer M., Möbius K., MacMillan F. and Lubitz W. J. (1993)**  
*Phys. Chem.* **97** : 7639-7647

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Byers T, Bowman B. (1993) *Nutr. Rev.* **51** : 333-336

### C

Chakrabarti D., Schuster S. M. and Ratna Chakrabarti (1993) *Proc. Natl. Sci. Vol.* **90** : 12020-12024

Climent I., Sjöberg. B.-M. and Hung C. V. (1992) *Biochemistry* **31** : 4801-4807

Climent I., Sjöberg B.-M and Huang C. Y. (1991). *Biochemistry*, **30** : 5164-5171

Cohen E. A., Gaudreau P., Brazeau P. and Langelier Y. (1986).. *Nature* **321** : 441-443.

Consentino G., et al., and Guindon Y. (1991).. *Biochem. Cell Biol.* **69** : 79-83

Covès J., Delon B., Climent I., Sjöberg B-M. and Fontecave M. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **223** : 357-363

Covès J, Fontecave M (1993) *Eur J Biochem* **211** : 635-641

Covès J., Laulhère J.P. and Fontecave M. (1997). *J. Biol. Chem.* **2** : 418-426

### D

Davydov R, Kuprin S, Gräslund A, Ehrenberg A (1994) *J Am Chem Soc* **116** :11120-11128

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Davydov R, Sahlin M, Kuprin S, Gräslusnd A, Ehrenberg A (1996) *Biocmemistry* 35 : 5571-5576

DeMaré F., Kurtz D. M., Nordlund P (1996) *Nat. Struct. Biology* 3 : 539-546

Döbelnvon U. and Reichard P. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 3616-3622

Dutia B. M., Frame M. C., Subak-sharpe J. H., Clark W. N. and Marsden H. S. (1986). *Nature* 321 : 439-441

### E

Ehrenberg A., Reichard P. (1972). *J. Biol. Chem.* 247 : 3485-3488

Eiserich J. P., Butler J., Van der Vliet A., Cross C. E. and Halliwell B. (1995) *Biochem. J.* 310 : 745-749

Eiserich J. P., Shibamoto T. (1994) *J. Agric. FoodChem.*42 : 1060-1063

Ekberg M, Sahlin M, Eriksson M, Sjöberg B-M (1996) *J Biol Chem* 271 : 20655-20659

Elford L. H., Freese M., Passamani E. and Morris H. P. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5528-5233

Elford H. L., Wampler G. L., Van t Riet B. (1979). *Cancer Res.* 39 : 844-851

Eliasson R., Pontis E., Jordan A. and reichard P. (1996) *J. Biol. Chem.* 271 : 26582-26587

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Eriksson M., Uhlin U., Ramaswamy S., Ekberg M., Regnström K., Sjöberg B.-M., Eklund H. (1997) *Structure* **5** : 1077-1092

### F

Feher G., Isaacson R. A., Okaruma M. Y. and Lubitz W (1985) Springer-verlag berlin, **107** : 174-189

Fieschi F., et al.(1998) *J. Biol. Chem.* **273**(8) : 4329-4337

Fontecave M., Eliasson R. and Reichard P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2147-2151

Fontecave M., Eliasson R., and Reichard P. (1989) *J. Mol. Chem.*, **264** : 9164-9170

Fontecave M., Eliasson R. and Reichard P.(1987) *J. Biol. Chem.*, **262** : 12325-12331

### G

Gao W-Y., Johns D.G., Choekijchai S. and Misuya H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 8333-8337

Gaudu P., Nivière V., Pétillet Y., Kauppi B. and Fontecave M. (1996). *FEBS Lett.* **387** : 137-140



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Gerez C. and Fontecave M. (1992) Biochemistry.31 :780-786**

**Gerez C, Gaillard J, Latour J-M, Fontecave M (1991) Angew Chem Int Ed Eng 30 : 1135-1136**

**Gerfen G. J., Bellew B. F., et al. (1993) J. Am. Chem. Soc.115 : 6420-6421**

**Girard P.,and Poitier P. (1993) FEBS Lett.320 : 7-8**

**Gleason FK., Hogenkamp HP ; (1972) Biochi Biophys Acta 277 :466-470**

**Goldberg DM, Yan J, Ng E, et al. (1994) Anal Chem;66 :3959-63.**

**Gorham J. The stilbenoids. Progr Phytochem 1980 ;6 :203-52.**

**Graslund A., Sahlin M., Sjöberg B.-M. (1985) Environm. Health Perspect.64 : 139-149.**

**Gray H. B. and malmström B. G.(1989) Biochemistry 28 : 7449-7505**

## **H**

**Harder J., Eliasson R., Pontis E., Ballinger M.D. and Reichard P. (1992) J. Biol. Chem. 267 : 25548-25552**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Hendrich M. P., Elgren T. E. and Que L. J. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **176** : 705-710

Henry Y, Lepoivre M., Drapier J.-C., Drucroq C., Boucher J.-L. and Guisani A. (1993) *FASEB J.* **7** : 1124-1134

Hertel L. W., Kroin J. S., Misner J. W. and Tustin J. M. (1988) *J. Org. Chem.* **53** : 2406-2409

Hiriyanna K. T. and Ramakrishnan (1986) *Rv. Arch. Microbiol.* **144** : 105-109

Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K. and Pease L. R. (1989) *Gene (amst.)* **77** : 51-59

Hoganson C. W., Sahlin M., Sjöberg B.-M. and Babcock G.T. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118** : 4672-4679

Holler T. P., Hopkins P. B. (1989) *Anal. Biochem.*, **180** : 326-330.

Holmgren A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 13963-13966

Hrazdina G., Parsons G. F, Mattick L. R. (1985) *Am j Enol Vitic* **35** : 220-227

Huberts P. and Mizrahi V. (1995) *Gene* **164** : 133-136

## J

Jang M., Cai L., Udeani G. O., et al. (1997) *Science* **275** : 218-220

Jandret P., Bessis R., Gautheron B. (1991) *Am J Enol Vitic* **42** : 41-46.

Jordan A., Aragall E., Gibert I. and Barbé J. (1996). *Mol. Microbiol.* **19** : 777-790

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Jordan A., Gilbert I. and Barbé J. (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 3420-3427

Jordan A., Pontis E, Aslund F., Hellman U., Gibert I. and Reichard P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 8779-8785

Jordan A., Pontis E., Atta M., Krook M., Gibert I., Barbé J. and Reichard P. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 12892-12896.

### K

Kacza E. A., Gitterman C. O., Dulaney E. L. and Folkers K. (1962) *Biochemistry* , I, 340

Kanazawa J., Kakahashi T., Gomi K. and Okabe M. (1995) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **36** : 405

Kanner J., Harel S. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **237** : 314-321.

Karlsson M., Sahlin M. and Sjöberg B-M (1992) *J. Biol. Chem.* **267** : 12622-12626

Kjøller-Larsen I., Sjöberg B-M and Thelander L. (1982) *Eur. J. Biochem.* **125** : 875-881

Klotz I., Klippenstein G. L., Hendrikson W. A. (1976) *Science*, **192** : 335-344

Koppenol W. H., Moreno J. J., Pryor W. A., Ischiropoulos H. and Beckman J. S. (1992) *Chem. Res. Toxicol.*, **5** : 834-842

Kubo M., Kimura Y., Shin H., Haneda T., Tani T., Namba K. (1981). *Shoyakugaku Zashi* ;**35** : 58-61

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Kunkel T. A, Roberts J. D. and Zakour R. A. (1987) Methods Enzymol. 154 : 367-382**

**Kurtz Jr. D. M., Shriver D. F. and Klotz I. M. (1986) Coord. Chem. Rev., 34 : 145-178**

### L

**Lam K.-Y, Fortier D. G. and sykes A. G. (1990) J. Chem. Soc., Chem. Commun. : 1019-1021**

**Lammers M.and Follman H. (1983) Struct. Bonding (Berlin) 54 : 27-91**

**Lankinen H, Gräslund and Thelander L (1982) J. Virol. 41 : 893-900**

**Larsson Å (1984) Acta. Chem. Scand., B38 : 905-907**

**Lassman G., Thelander L. and Gräslund A. (1992). Biochem. Biophys. Res. Commun. 188(2) : 879-887**

**Lepoivre M., Chenais B., Yapo A., Lemaire G., Thelander L. and Tenu J.P. (1990). J. Biol. Chem. 265 : 14143-14149**

**Lepoivre M., Flamand J.M. and Henry Y. (1992) J. Biol. Chem. 267 : 22994-23000**

**Lepoivre M., Flamand J.M., Bobé P., Lemaire G., and Henry y. (1994) J. Biol. Chem. 269 : 21891-21897**

**Licht S., Gerfen G.J and Stubbe J. (1996) Science 271 : 477-481**

**Lin A. I., Ashley G. W. and Stubbe J. (1987) Biochemistry, 26 : 12249-12252**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Liu MC, Lin TS, Cory JG, Cory AH, Sartorelli AC (1996) J. Med. Chem. 39(13) : 2586-2593**

**Logan DT, Su XD, Åberg A, Regnström K, Hadju J, Eklund H, Nordlund P (1996) Structure 4 :1053-1064**

**Lori F., et al. And Gallo R. C. (1994) Science 266 : 801-805**

### **M**

**Malley S.D., Grange J.M, Hamedi-Sangsari F. and Vila J.R (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91 : 11017-11021**

**Mao S. S., Johnston M. I., Bollinger J. M. and Stubbe J. (1989) Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 86 : 1485-1489.**

**Mao S.S., Yu G.X., Chalfoun D. and Stubbe J. (1992) Biochemistry 31 : 9752-9759**

**Martell A. E., Anderson W. F. and Badman d. G.(1981) Eds. Development of Iron Chelators for Clinical Use ; Elseiver/ North-Holland : New York**

**Matzanke B. F., Müller-Matzanke G. and Raymond K. N.(1989) VCH publishers, Inc ; New York, Chapter I.**

**McCarthy J. R.and Sunkara P. S. (1995) In Chemical and structural approaches to Rational Drug Design. (Weiner D. B. & Williams W. B., eds) CRC Press, Boca raton . pp 3-32**

**McClements W., Yamanaka G., Garsky V., Bachetti S., Colonno R. and Stein B.R. (1988) Virology 31 : 270-273**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Mitsos S. E., Kim D., Lucchesi B. R., Fantone J. C. (1988) Lab. Invest 59 : 324-830.**

**Moore E. C. and Sartorelli A. C. (1989) Pergamon press pp 203-215**

**Moreno-Manas M., Pleixats R. (1985). Anal Quim ;81 :157-51.**

**Mulliez E., Ollagnier S., Fontecave M., Eliasson R. and Reichard P. (1995) Proc. Natl. Sci. 92 : 8759-8762**

### **N**

**Natan M. J., Kuila D., Baxter W. W., King B. C., Hawkrigde F. M. and Hoffman B. M., and Eklund H. (1990) Nature 345 : 593-598**

**Nocentini G. and Barzi A.(1997) Gen Pharmacol 29(5) : 701-706**

**Nonoruma S., Kanagawa H., Makimoto A. (1963) Yakugaku Zasshi ; 83 :988-90.**

**Nordlund P., Eklund H. (1993) J Mol Biol 232 : 123-164**

**Nordlund P., Sjöberg B-M and Eklund H. (1990) Nature 345 : 563-598**

**Nyholm S., Graham J. M., Johansson A.G., Bergeron R. J., Gräslund A. and Thelander L. (1993) J. Biol. Chem. 268 : 26200-26205.**

**Nyholm S., Thelander L. and Gräslund A. (1993) Biochemistry 32 : 11569-11574.**

### **O**

**Ollagnier S., Mulliez E., Gaillard J., Eliasson R., Fontecave M. and Reichard P. (1996) J. Biol. Chem. 271 : 9410-9416**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Ollagnier S., Mulliez E., Gaillard J., Mattioli T.A., Lutz M., Meier C. et al. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* In press

Ollagnier S., Mulliez E., Schmidt P.P., Eliasson R., Gaillard J., Deronzier C. et al. (1997) *J. Biol. ; Chem.* **272** : 24216-24223

Ormö M., deMaré F., Regnström K., Åberg A., Sahlin M., Ling J., Loehr TM., Sanders-Loehr J., Sjöberg B.-M. (1992) *J. biol. Chem.* **67** : 8711-8714

Ormö M., Regnström, Wang Z., Que L., Sahlin M. and Sjöberg B.-M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 6570-6576

### P

Padmaja S. and Huie R. E. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195** : 539-544

Panagou D., Orr M. D., Dunstone J. R and Backley R. L. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2378-2388

Paradis H., Gaudreau p., Brazeau P. and Langelier Y. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263** : 16045-16050

Persson B. O., Karlsson M., Climent I., Ling J., Sanders-loehr J., Sahlin M., Sjöberg B-M (1996) *J Biol Inorg Chem* **1** : 247-256

Pötsch S., Salhin M., Langelier Y., Gräslund A. and Lassmann G. (1995) *FEBS Lett.* **374** : 95-99

**R**

**Ravi N., Bollinger J. M., Huynh B. H., Edmondson D. E., and Stubbe J. (1994) Am Chem Soc 116 : 8007-80014**

**Reichard P. (1997) Trends in Biochem. Sci. 22 : 81-85**

**Reichard P. and Ruberg L. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 37 : 554-555**

**Reichard P. (1988) Ann. Rev. Biochem 57 : 349-374**

**Riera J., Robb F.T., Weiss R. and Fontecave M. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 475-478**

**Ronsenzweig A. C., Frederick C. A., Lippard S. J. and Nordlund P. (1993) Nature 366 : 537-543**

**Rova U., Goodtzova K., Ingelmarson R., Behravan G., Gräslund A, Thelander L. (1995) Biochemistry 34 : 4267-4275**

**Roy B., Lepoivre M., Henry Y. and Fontecave M. (1995) Biochemistry 34 : 5411-5418**

**S**

**Sahlin M., Gräslund A., Petersson L., Erhenberg A. and sjöberg B.-M. (1989) Biochemistry, 28 : 2618-2665**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Sahlin M., Lassman G., Pösch S., Slaby A., sjöberg B.-M., Gräslund A (1994) J biol Chem **269** : 11699-11702

Sahlin M, Lassmann G, Pösch S, Sjöberg B.-M, Gräslund A (1995) J Mol Chem **270** : 12361-12372

Sahlin M., Petersson L., Gräslund A., Ehrenberg A., Sjöberg B-M. and Thelander L. (1987) Biochemistry **26** : 5541-5548

Sahlin M., Sjöberg B.-M, Backes G., Loehr T. and Sanders-Loehr J. (1990) Biochem. Biophys. Res. Comm., **167** : 813-818

Sauge-merle S., Laulhère J.P., Covès J., Le Pape L., Ménage S., Fontecave M. (1997) JBIC **2** : 586-594

Seigneur M., Bonnet J., Dorian et al. (1990) J Appl Cardiol, **5** : 215-222

Sharma S., Stutzman J. D. Kellof G. J. and Steele V. E.(1994) Cancer Res. **54** : 5848

Sheriff S., Hendrikson W. A. and smith J. L. (1987) J. Mol. Biol., **197** : 273-296

Siegel (1994) Metals in Biological Systems Metalloenzymes involving Amino-acid Residues and related radicals vol. 30, **34** : 14093-14103

Sieman EH, creasy LL. (1992) Am J Enol Vitic **43** :49-52.

Silva K. E., 0Elgren T. E., Que L., Stankovich M. T. (1995) Biochemistry

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Sjöberg B.-M. (1994) Structure 2 : 793-796**

**Sjöberg B.-M. (1995) In : Eckstein F., Lilley DMJ (eds) Nucl Acids Mol Biol, Vol 9, pp 192-221 Springer, Berlin Heidelberg New york**

**Sjöberg B.-M., Hahne S., Karlsson M., Jörnvall H., Göransson M. and Uhlin B. E. (1986) J. Biol. Chem. 261 : 5658-5662**

**Sjöberg B.-M, Reichard P., Gräslund A. and Ehrenberg A. (1985) J. Biol. Chem., 252 : 6863-6865**

**Soleas G. J., Diamandis P. and Goldberg D. M. (1997) Clinical Biochemistry, vol 30 n°2 : 91-113**

**Stampfer M. J., Rimm E. B.(1995) Am J Clin Nutr 62 : 1365-1369S**

**Stenkamp R. E., Siecker L. C. and Jensen L. H. (1984) J. Am. Chem. Soc., 106 : 618-622**

**Stubbe J. (1990) Ribonucleotide reductase. Adv. Enzymol., 63 : 349-419**

**Stubbe J. and Van der Donk W. (1995) Chemistry and Biology 2 : 793-801**

**Sturgeon B.E., Burdi D., Chen S, Huynh B.H., Edmondson D.E., Stubbe J. et al. (1996) J. Am. Soc. 118 : 7551-7557**

**Sun X., Ollagnier S., Schmidt P .P., Atta M., Mulliez E., Lepape L. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 : 6827-6831**

**Swarts J. C.,and sykes A. G. (1994) Anti-cancer Drug Des., 9 :41-50**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Swarts J., Aquino M., Han J.Y., Lam K.Y., Sykes G. (1995)** *Biochimica et Biophysica Acta* **1247** : 215-224

### T

**Takeda E, Weber G (1981)** *life sciences*, **28** : 1007-1014

**Tauer A. and Benner, S. (1997)** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94** : 53-58

**Thelander L. (1974).** *J. Biol. Chem.*, **249**, 4858-4862

**Thieren M. J., Selman M. A., Gray H. B., Chang I.-J. and Winkler J. R. (1990)** *J. Am. Chem. Soc.* **112** : 2420-2422.

**Tong W. H., Chen S., Lyoyd S.G., Edmonson D. E., Huynh B. H., Stubbe J (1996)** *J. Am. Soc.* **118** : 2107-2108

### U

**Uhlin U. and Eklund H. (1994)** *Nature* **370** : 533-539

**Un S., Atta M., Fontecave M. and Rutheford W. (1995)** *J. Am. Chem. Soc.* **117** : 10713-10719

### W

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Wayne L. G. (1994)** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13** : 908-914

**Willing A., Follman H. and Auling G. (1998)** Eur. J. Biochem. **170** : 603-614

### Y

**Yang F., Curran S. C. Li, Avarbock D., Graf JD., Chua M., Ku G., Salem J and Rubin H. (1997)** Journal of Bacteriology. **179** : 6408-6415.

**Yang F., Lu G. and Rubin H.(1994).** Journal of Bacteriology. **176** : 6738-6743

**Yang F.-D., Spanevello R. A., Celiker I., Hirschmann R., Rubin H. and cooperman B. S. (1990).** Febs Lett. **272** : 61-64

**Young P., Andersson J., Sahmin M. and Sjöberg B-M. (1996)** Biol.. Chem. **271** : 20770-20775

### Z

**Zannis V. I., Breslow J. L., Sangiacomo T. R., Aden D. P. and Knowles B. B. (1981)** Biochemistry **20** : 7089-7096

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## **PUBLICATIONS**

---

## **PUBLICATIONS**



## Reactivity of the tyrosyl radical of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase Control by the protein

Catherine GEREZ<sup>1</sup>, Eric ELLEINGAND<sup>1</sup>, Björn KAUPPI<sup>2</sup>, Hans EKLUND<sup>2</sup> and Marc FONTECAVE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, Université Joseph Fourier, CNRS UMR 5616, Chimie-Recherche, Grenoble, France

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, Swedish University of Agricultural Sciences Biomedical Center, Uppsala, Sweden

(Received 20 May/11 July 1997) – EJB 97 0697/3

Ribonucleotide reductase is a key enzyme for DNA synthesis. Its small component, named protein R2, contains a tyrosyl radical essential for activity. Consequently, radical scavengers are potential antiproliferative agents. In this study, we show that the reactivity of the tyrosyl radical towards phenols, hydrazines, hydroxyurea, dithionite and ascorbate can be finely tuned by relatively small modifications of its hydrophobic close environment. For example, in this hydrophobic pocket, Leu77→Phe mutation resulted in a protein with a much higher susceptibility to radical scavenging by hydrophobic agents. This might suggest that the protein is flexible enough to allow small molecules to penetrate in the radical site. When mutations keeping the hydrophobic character are brought further from the radical (for example Ile74→Phe) the reactivity of the radical is instead very little affected. When a positive charge was introduced (for example Ile74→Arg or Lys) the protein was more sensitive to negatively charged electron donors such as dithionite. These results allow us to understand how tyrosyl radical sites have been optimized to provide a good stability for the free radical.

**Keywords:** ribonucleotide reductase; tyrosyl radical; electron transfer; hydroxyurea; phenol.

Ribonucleotide reductase is an essential enzyme in all living organisms as it catalyzes the reduction of ribonucleotides and thus provides the cells with the correct concentrations of deoxyribonucleotides required for DNA synthesis [1]. The enzyme from *Escherichia coli* is the prototype for eukaryotic class I ribonucleotide reductases which consist of a 1:1 complex of two non-identical homodimer proteins, named R1 and R2 [2]. Protein R1 has binding sites for the substrates and provides the reducing equivalents in the form of redox-active cysteines. Protein R2 contains a dinuclear non-heme iron center and a stable tyrosyl radical, located on Tyr122, absolutely necessary for ribonucleotide reduction. Hydroxyurea is an efficient scavenger of this protein radical and therefore a good inhibitor of ribonucleotide reductase and DNA synthesis [3]. It is actually used as an anticancer drug in clinics.

In order to design more-active drugs, it is important to understand which parameters are controlling the radical reactivity. The three-dimensional structure of *E. coli* protein R2 provides unvaluable information about the radical-site topology [4]. It shows that the radical is located in a very hydrophobic pocket which contributes to its stability [5]. Accordingly, mutating the three invariant hydrophobic residues present in this pocket (Phe208, Phe212 and Ile234) into more hydrophilic ones resulted in proteins with much shorter radical half-lives [5].

Furthermore the radical is deeply buried within the protein, more than 10 Å away from the closest surface. It has thus been proposed that radical scavengers and reducing agents cannot gain access to the radical site but rather react through long-range radical transfers from the surface to the interior of the protein. However, there is still no experimental data allowing us to distinguish unambiguously between direct and indirect transfer.

In the present study we address the question of the control of the reactivity of the tyrosyl radical by the protein with the help of site-directed protein R2 mutants. While a rather large number of such mutants have been previously reported, only in a few cases were they characterized in terms of the reaction of the tyrosyl radical with radical scavengers [6, 7].

As we have previously observed that the tyrosyl radical was very sensitive to hydrophobic electron donors [8, 9], we looked for the presence of a hydrophobic channel which would connect the surface of the protein to the radical hydrophobic site. The three-dimensional structure actually reveals that the phenyl ring of Tyr122 can be seen from the exterior of the protein through a very hydrophobic, rather empty channel consisting of two layers of hydrophobic residues: Val136, Ile74 and Val130 in the external one, Val135, Leu77 and Ile126 in the internal one, arranged in a threefold symmetry (Fig. 1).

To investigate the role of some of these residues in the transport of hydrophobic radical scavengers, site-directed mutagenesis was applied to introduce side chains with different properties into the channel. Leu77, 5 Å away from the tyrosyl radical, was changed to the larger phenylalanine residue in order to limit the access to the radical, with little modification of the hydrophobic character of the area. As decreased hydrophobicity in the close environment of the radical has a drastic effect on its half-life,

Correspondence to M. Fontecave, Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, Université Joseph Fourier, CNRS UMR 5616, Chimie-Recherche, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 09, France  
Fax: + 33 4 76 51 43 82.

E-mail: Marc.Fontecave@ujf-grenoble.fr

Enzymes. Ribonucleoside-diphosphate reductase (EC 1.17.4.1); alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1).



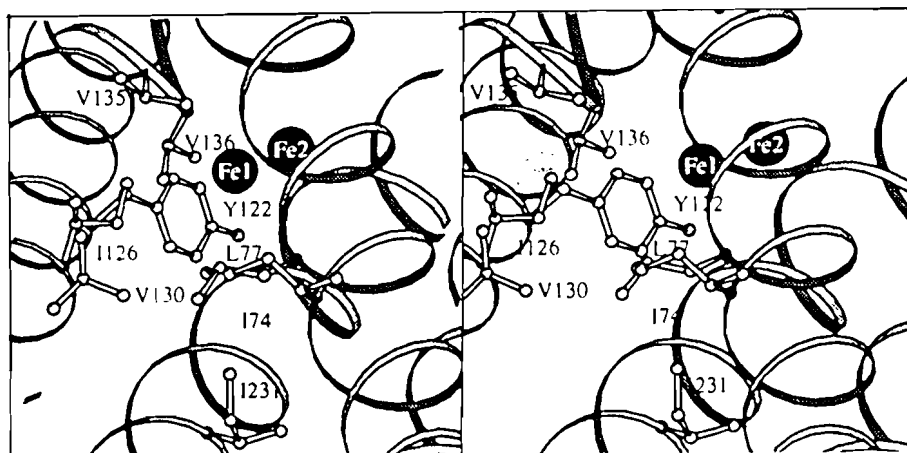


Fig. 1. Three-dimensional structure of the hydrophobic channel connecting the surface of protein R2 to the radical site.

we avoided mutations of Leu77 to less hydrophobic residues. Further, amino acids Val136 and Ile74 were replaced with positively charged residues (arginine or/and lysine) in order to both decrease the free space of the channel and to change its electrostatic properties. Ile74 was also changed to phenylalanine to increase the Van der Waals volume of the side chain while still keeping its hydrophobic character.

In this study, the different mutant proteins are characterized in terms of the properties of the iron-radical center and in terms of the sensitivity of the tyrosyl radical to scavengers or reducing agents such as phenols, hydrazines, hydroxyurea, dithionite and ascorbate.

## MATERIALS AND METHODS

**Plasmids and bacterial strains.** Plasmid pTB2, containing the *nrdB* gene which codes for the R2 protein [10] was kindly supplied by Prof. B.-M. Sjöberg (Dept of Molecular Biology, Stockholm University, Sweden). Plasmid pVNR2 was constructed by cloning the *EcoRI*–*HindIII* fragment of pTB2 into the expression vector pJF119EH, a pKK223-3 derivative that contains a polylinker sequence flanked on one side by the isopropyl thio- $\beta$ -D-galactopyranoside-inducible *tac* promoter and on the other side by two strong transcriptional terminators [11].

The following *E. coli* strains were used as hosts for pTB2 plasmids and derivatives: CJ236 ( $F'$ , *dut*<sup>-</sup>, *ung*<sup>-</sup>) was used for preparation of uracil-containing recombinant M13 single-stranded DNA; TG1 and JM109 were used for M13 single-stranded and double-stranded DNA preparation, respectively. For routine plasmid manipulation, *E. coli* DH5a was used. Overexpression of mutated R2 proteins was achieved in *E. coli* K12.

**Site-directed mutagenesis.** The oligonucleotides used for mutagenesis were obtained from the Institut Pasteur. They are (mismatches underlined):

U-L77F, d(5'-AGCAACTTTAAATATCAGACG-3'); L-L77F, d(5'-CGTCTGATATTTAAAGTTGCT-3'); U-V136R, d(5'-TCTGTTAGCTTTGACGAT-3'); L-V136R, d(5'-ATCGTCAAAGC-TAACAGA-3'); U-I74F, d(5'-CACATCTTTTCAGCAAC-3'); L-I74F, d(5'-CAGGTTGCTGAAAAAGATGTG-3').

For the [Lys74]R2 and [Arg74]R2 mutants, a degenerate oligonucleotide was used: d(5'-GTTGCTCYTAAAGATGTG-3').

Two other oligonucleotides were used as flanking primers for PCR:

FLPCR1 d(5'-GCTCTCTTTCTTCTGGCG-3') and FLPCR2 d(5'-TGGAAGTTACTCAAATCG-3').

The mutants [Phe77]R2, [Arg136]R2 and [Phe74]R2 were obtained by a PCR overlap extension procedure [12]. PCR final reaction products were purified by agarose gel electrophoresis, digested with *AatII/KpnI* and subcloned into pVNR2. The entire *nrdB* gene was sequenced. Besides the desired mutations, no other modifications were found.

Mutagenesis of pTB2 to [Arg74]R2 and [Lys74]R2 was performed using the Kunkel method [13]. The *EcoRI*–*HindIII* fragment from pTB2 was cloned into the replicative form of M13mp19 to give M13R2. Single-stranded M13R2, isolated from *E. coli* CJ236, was used as a template for mutagenesis. The two mutated *nrdB* genes were completely sequenced and subcloned into the expression vector pJF119EH.

**Media and growth conditions.** Plasmids pVNR2 and pJF119EH carrying the mutated *nrdB* genes were transformed into *E. coli* K12. Bacterial cells were grown in Luria-Bertani medium containing ampicillin (150  $\mu$ g/ml) and supplemented with iron ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 5  $\mu$ g/ml) at 37°C. Growth was monitored by following the absorbance at 600 nm. Induction of R2 recombinant protein was performed by adding isopropyl thio- $\beta$ -D-galactopyranoside to a final concentration of 1 mM when the absorbance was about 0.6. Cells were harvested in the late exponential phase, pelleted by centrifugation at 7000 $\times$ g and stored at -80°C.

**Purification of wild-type and mutant proteins R2.** The purification was performed according to Sjöberg et al. [14].

**Protein determinations.** The protein concentrations were determined both spectrophotometrically using a molar absorption coefficient  $\epsilon_{280, 310}$  of 120000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , and colorimetrically [15]. The iron content was determined spectrophotometrically using a molar absorption coefficient,  $\epsilon_{470}$ , of 8700  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [16]. The radical content was determined by Ultra-violet-visible spectroscopy by subtracting the spectrum of metR2, the inactive R2 protein form lacking the radical, from the spectrum of R2 proteins and using a molar absorption coefficient at 410 nm of 3250  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [15]. In some cases, the radical content was determined by EPR spectroscopy by comparing the intensity of the characteristic EPR signal to that of a calibrated sample of pure protein R2.

**Reconstitution of R2 mutant proteins.** In some cases, the mutant proteins were partly obtained in the apoprotein form. Reconstitution of the iron-radical center of these proteins was achieved during incubation with ferrous iron in the presence of oxygen using the method described by Atkin et al. [16]. The iron and radical contents were then quantitated as described above.

**Table 1. Characteristics of the purified mutant R2 proteins.** Relative iron content was determined from the absorbance at 370 nm. Proteins were reconstituted during incubation with ferrous iron in the presence of oxygen followed by desalting on Sephadex G25. The radical/R2 ratios were measured as described in Materials and Methods. The radical half-lives were determined from the spontaneous decay of the absorbance at 410 nm at 25°C. Specific activities are values after correction for radical content. n.d., not determined.

Protein	Relative iron content		Radical/R2		Radical half-life	Specific activity
	before reconstitution	after reconstitution	before reconstitution	after reconstitution		
						nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup>
R2	1	—	1	—	days	5350
[Val136]R2	0	0.5	0	0.3	20 min	n.d.
[Phe77]R2	0.8	1	0.6	0.8	days	3200
[Lys74]R2	0.2	0.8	0.17	0.65	8	5200
[Arg74]R2	0.2	0.5	0.2	0.4	1 day	2600
[Phe74]R2	0.2	0.8	0.2	0.7	days	2500

**Enzyme activity.** The reaction mixture contained protein R1 and the reagents required for reduction of [<sup>3</sup>H]CDP [17]. After incubation at 30°C for 10 min, the reaction was stopped by heating the mixture at 100°C for 1 min. After 5 min centrifugation at 12000×g to remove the precipitated proteins, 1 U alkaline phosphatase was added to the supernatant and incubated for 1 h at 37°C. The enzyme was then denatured at 100°C for 1 min. The supernatant collected after 10 min centrifugation at 12000×g was loaded onto a AG1X8 column from Bio-Rad previously equilibrated with water. All the [<sup>3</sup>H]dCMP formed was eluted with water and the radioactivity was counted in a LKB scintillation counter. 1 U activity is defined as the formation of one nmole of dCMP.

**Crystallization and data collection.** Screening under wild-type crystallization conditions, 20% poly(ethylene glycol) 4000, 50 mM Mes, pH 6.0, 0.2 M NaCl, 0.3% dioxane and 0.05 M of the mercury-containing compound ethylmercurithiosalicylate at 20°C [18] resulted only in crystalline precipitates. Crystals suitable for X-ray diffraction were obtained after micro-seeding with wild-type crystals and only for the [Phe77]R2 mutant. Data collection was performed at 4°C using an R-AXIS II image-plate detector connected to a rotating anode. Denzo and Scalepack [19] were used to index and reduce the data. Space group P212121 and cell dimensions were isomorphous with the native data and were postrefined to  $a = 74.3$ ,  $b = 85.2$ ,  $c = 115.3$ . The number of unique reflections measured were 20151 to 2.7-Å resolution, giving an over-all redundancy of 5.8. The final dataset was 98.8% complete (98.3% in highest resolution shell) and had an  $R_{\text{sym}}$  of 0.12 (0.34). The over-all  $I/\sigma$  7.4 (5.5).

**Structure analysis.** A difference Fourier map on observed structure factors,  $F_{\text{obs}} - \text{mutant} - F_{\text{obs}} - \text{native}$ , showed clear positive density at the mutated residue [Phe77]R2. Apart from that, positive and negative density were present only at the mercury positions. The closest mercury site is 6.9 Å away from the  $\gamma$  carbon of the mutated residue and should thus not influence its orientation. After refinement of the mercury occupancies, the positive and negative densities vanished and a rigid body and later positional refinement in TNT [20] lowered the initial crystallographic  $R$  factor from 31.5% to 21.8% with good stereochemistry.

**Spectroscopic measurements. EPR spectroscopy.** Wild-type or mutant protein R2 (final concentration 11  $\mu$ M) was dissolved in 200  $\mu$ l of 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5. A reference spectrum at 100 K was recorded. Then, we added a small volume of the radical scavenger solution, mixed, and incubated the EPR tube at 37°C. The incubation was stopped at time intervals by freezing the sample at liquid-N<sub>2</sub> temperature. Protein preparations

were stable during freezing and thawing. First-derivative EPR spectra were recorded under non-saturating conditions, on a Bruker ESP300E spectrometer. The loss of the radical was quantitated from the amplitude of the  $g = 2.00$  signal.

**Light-absorption spectroscopy.** When hydrazine was used as a reductant, the experiments were carried out under anaerobic conditions and followed by using a UVIKON 930 spectrophotometer. The spectroscopic cuvette capped with a rubber septum was deaerated by flushing for 2 h with argon. Addition of deaerated solutions of protein and scavengers were made through the septum with gas-tight syringes that had been thoroughly washed with deoxygenated water. The cuvette was incubated at 37°C and optical spectra were recorded at time intervals.

## RESULTS

**Characterization of the iron-radical center of the mutant R2 proteins.** All of the mutant proteins [Arg136]R2, [Lys74]R2, [Arg74]R2, [Phe74]R2 and [Phe77]R2 were purified to homogeneity according to the standard procedures developed for the wild-type R2 protein [14]. They showed, after purification, different iron and radical contents (Table 1). After reconstitution with ferrous iron in the presence of oxygen, under standard conditions previously used for full activation of the apoprotein form of the wild-type enzyme [16], [Phe77]R2, [Lys74]R2, [Phe74]R2 mutant proteins had iron and radical contents as well as enzyme activities only slightly smaller than those of wild-type protein R2. The iron-radical center of the mutant [Arg74]R2 was more difficult to reconstitute but, nevertheless, the final protein had a good activity. In these four mutant proteins, the tyrosyl radical was stable even though its half-life in [Lys74]R2 and [Arg74]R2 was significantly decreased (Table 1). Only the Val136→Arg mutation resulted in a very unstable iron-radical center and thus could not be studied further. The light absorption and EPR spectra of mutant proteins were not significantly different from those of the wild-type R2 (data not shown).

The [Phe77]R2 protein could be crystallized and its three-dimensional structure was solved by using the wild-type structure as the initial model [4]. The refined structure confirmed that the mutant protein contains a phenylalanine at position 77 (Fig. 2). It is obvious that the hydrophobic channel from the surface to the radical is now occupied by the introduced phenyl ring of phenylalanine which seems to block the access to the radical. The mutant shows no other differences compared with the wild-type R2, within experimental error, indicating that the phenotypic differences between mutated and wild-type proteins

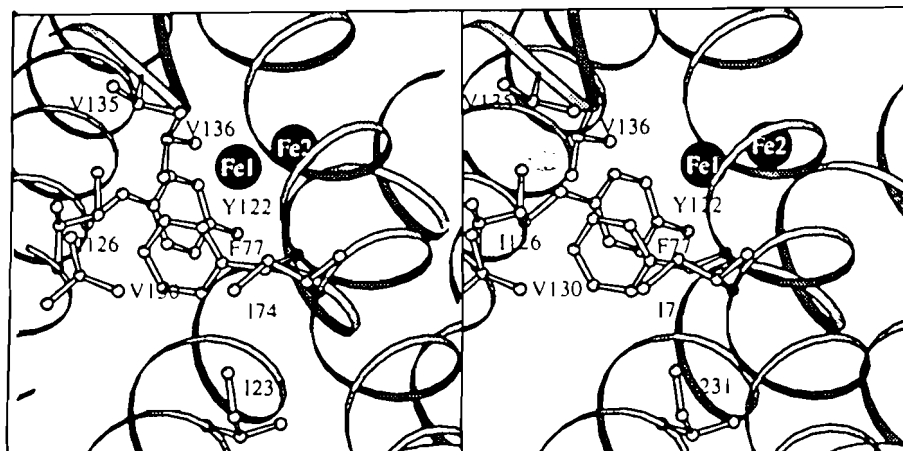


Fig. 2. Three-dimensional structure of the channel in the [Phe77]R2 protein.

Table 2. Reactivity of reducing agents towards the tyrosyl radical of wild-type R2 and mutant R2 protein. Assays were carried out at 37°C as described in Materials and Methods. The remaining EPR amplitude varies from 100 (no scavenging of the radical) to 0 (total scavenging of the radical). The incubation time was 20 min.

Reducing agents	Remaining EPR amplitude of				
	R2	[Lys74]R2	[Arg74]R2	[Phe74]R2	[Phe77]R2
	%				
Phenol (1 mM)	67	58	68	60	52
2,6-Dimethylphenol (0.1 mM)	54	40	51	35	10
2,4,6-Trimethylphenol (0.1 mM)	45	40	36	50	5
2,6-Dichlorophenol (1 mM)	82	50	52	68	15
Phenylhydrazine (0.1 mM)	80	55	63	63	17
Hydrazine (10 mM)	74	63	74	70	6
Hydroxyurea (1 mM)	19	0	0	15	13
Dithionite (10 mM)	70	14	0	62	70
Ascorbate (10 mM)	100	61	59	88	94

are only due to the Leu→Phe mutation. This also shows that space is available for additional molecules in the radical pocket.

**Reduction of the tyrosyl radical by phenols, hydrazines, hydroxyurea, dithionite and ascorbate.** The reduction of the tyrosyl radical of wild-type R2 and mutant R2 proteins was monitored by EPR spectroscopy. The amount of radical can be easily determined from the amplitude of its characteristic EPR signal at  $g = 2.00$  at liquid N<sub>2</sub> temperature. With hydrazine as a reducing agent, the reaction was carried out under anaerobic conditions and followed by light absorption spectroscopy from the decay of the peak at 410 nm, characteristic of the tyrosyl radical. The results are presented in Table 2 in terms of the amount of radical remaining after 20 min reaction of 11 μM reconstituted protein with the indicated concentration of radical scavenger at 37°C. The [Phe74]R2 tyrosyl radical had a reactivity comparable to that of the wild-type radical, for each of the nine compounds studied. As previously shown [8], phenylhydrazine was a much better tyrosyl-radical scavenger than hydrazine, as 0.1 mM phenylhydrazine had roughly the same effect as 10 mM hydrazine.

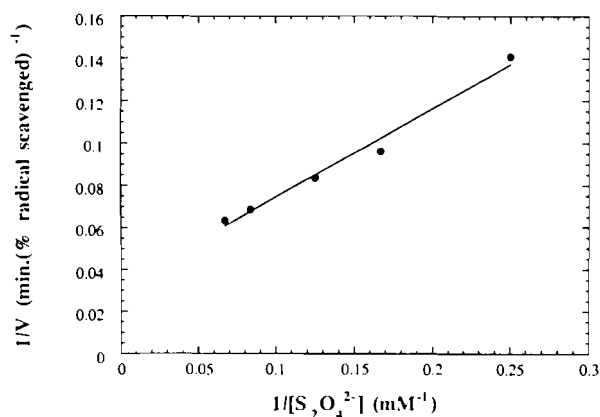
As expected, [Arg74]R2 and [Lys74]R2 gave similar results, as changing a residue into arginine or lysine brings the same kind of chemical modification. These two mutants in general reacted with differently substituted phenols and hydrazines as

did wild-type R2. They were more sensitive than wild-type R2 to dithionite, hydroxyurea and ascorbate, to a lesser extent. The reactivity of dithionite is remarkable, considering the well-known resistance of wild-type R2 to negatively charged electron donors.

The [Phe77]R2 mutant had an opposite behavior. Its reactivity towards dithionite, hydroxyurea and ascorbate was comparable to that of wild-type R2. However, it was much more sensitive to phenols and hydrazines. In particular the effect of increasing the number of methyl groups at the phenol ring on tyrosyl-radical scavenging was much more pronounced than in the case of wild-type R2.

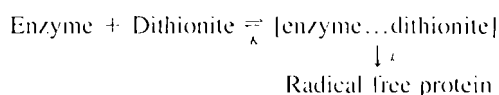
**Kinetics of the [Lys74]R2 and [Arg74]R2 tyrosyl-radical reaction with dithionite.** Since introduction of a positively charged residue at position 74 led to a much greater reactivity of negatively charged electron donors such as dithionite, we reasoned that an electrostatic interaction might have allowed a rather tight substrate/protein binding, responsible for an efficient electron transfer to the radical.

In a series of experiments, the initial rate of the reaction of the [Lys74]R2 and [Arg74]R2 tyrosyl radicals with dithionite was studied as a function of dithionite concentration between 4 mM and 20 mM at 37°C. In this concentration range, we found an obvious saturation effect for this reaction, suggesting



**Fig. 3.** Reduction of the [Arg74]R2 tyrosyl radical by dithionite. Initial rates as a function of dithionite concentration (double-reciprocal plot).

the existence of a specific saturable pathway for electron transfer from a dithionite site to the radical. As shown in Fig. 3, in the case of [Arg74]R2, double reciprocal plots of initial enzyme reduction velocities versus dithionite concentrations actually gave a line. This is consistent with a kinetic scheme:



The intersection of the line with the abscissa gives the dissociation constant of the complex (12 mM) if one assumes that establishment of the first equilibrium is not the rate-limiting factor. The same kind of experiment with the mutant [Lys74]R2 gave a value of 18 mM (data not shown).

## DISCUSSION

The tyrosyl radical of ribonucleotide reductase is deeply buried inside the small protein R2 [4]. Furthermore it is located in a very hydrophobic pocket consisting of Phe208 and 212, Ile234 and Leu77. This design is essential for the protection of such a reactive species [5]. However, the oxidizing potential of the radical is required for ribonucleotide reduction and it is the key function of the protein to properly direct the electron transfers. It is generally accepted that proteins R1 and R2, in concert, provide a pathway for a long-range electron transfer from a cysteine residue on the large protein R1 to the tyrosyl radical on the small protein R2 [21]. This generates a putative thyl radical necessary for substrate activation [22]. Protection of the redox center, on the one hand, and setting long-range electron transfer pathways, on the other hand, here provide the adequate strategy for the control of the required radical chemistry.

In spite of the exquisite control of its reactivity, the radical can be destroyed by exogenous compounds which thus have antiproliferative properties. One-electron reduction of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase is a chemical basis for the design of anticancer and antiviral drugs. However, the thermodynamic and stereoelectronic parameters which control the reaction still need to be better appreciated in order to find more efficient inhibitors.

The exact redox potential of the radical is difficult to determine. It has been estimated at  $E = 1$  V, in the range of the tyrosine side chain neutral phenoxy radical ( $E = 940$  mV at pH 7.0) [23]. This means that the driving force for the reduction of the

tyrosyl radical can be large and is in general not the limiting factor.

Because of the steric protection of the radical, it is generally observed that only small molecules are reactive and that increasing the size of the radical scavenger decreases the inhibitory effect.

However, several observations indicate that the rate of the reduction is not primarily controlled by the thermodynamic driving force and the steric constraints. Charge and hydrophobicity of the radical scavenger seem to be important parameters to consider. First, negatively charged dithionite is a rather poor electron donor, in spite of its very low redox potential. In contrast, the tyrosyl radical is very efficiently reduced by positively charged electron donors such as reduced viologen cation-radicals [24]. This may reflect the large number of negatively charged aspartate and glutamate residues in the iron site nearby the radical site. Second, several studies have shown that the increased hydrophobicity of the scavenger, and in particular the presence of a phenyl group, greatly promotes its reactivity [8]. For example, phenylhydrazine is much more active than hydrazine, even though it is much bigger and its redox potential much more positive (phenylhydrazine, 250 mV; hydrazine,  $-1.2$  V at high pH) [25]. It has been shown that at pH 7.5 the rate constants are more than  $10^2$ -times greater than those for the hydrazine reduction. Also, phenylhydroxamic acid is more active than the ethyl derivative [9].

Here, we confirm both the importance of an hydrophobic environment as a stabilizing factor for the radical and the importance of the hydrophobic character of the radical scavengers: (a) introduction of a charge at proximity of the radical by site-directed mutagenesis results in a decrease of the half-life of the latter in the [Lys74]R2 and [Arg74]R2 mutants. The effect is less important than in previously reported [Tyr208]R2, [Trp212]R2, [Tyr212]R2 and [Asn234]R2 mutants [5], probably because the modifications here are further from the radical. In contrast, introducing modifications which maintain hydrophobicity had no effect on radical stability ([Phe74]R2 and [Phe77]R2 mutants) (Table 1). Unfortunately, we have no information on the structural impact of the mutations at Ile74, since all mutants gave small crystals, not suitable for X-ray diffraction. All the mutation sites are far away from any crystal contacts and there is no obvious explanation of why these mutations could alter the crystal packing. Maybe some other small changes exist in the interaction area in the crystal. Mutation of Val136 to an Arg had a great impact on the stability of both the iron center and the radical. Considering the orientation of this residue shown by the three-dimensional structure of protein R2, it is likely that the positive charge at the end of the extended side chain of the arginine comes very close to the iron-radical center and thus greatly perturbs the arrangement of this center (data not shown); (b) the more hydrophobic the radical scavenger, the more efficient the reaction, as shown from the greater activity of trimethylphenol, compared with phenol, and of phenylhydrazine, compared with hydrazine, in all studied wild-type and mutated proteins.

Comparison of [Phe74]R2 and [Phe77]R2 with wild-type R2 in terms of the reactivity of their tyrosyl radical with phenols and hydrazines allowed us to show that only when the modification is in close proximity to the radical are there significant effects of the mutation. [Phe74]R2 behaved more like wild-type R2 for all tested neutral reductants, except for hydroxyurea (Table 1). This is also true for [Arg74]R2 and [Lys74]R2.

In contrast, mutation of Leu77 to the more hydrophobic phenylalanine greatly increased the reactivity of the radical (compare wild-type R2 and [Phe77]R2 for their reactivity with trimethylphenol and phenylhydrazine, for example), even though the accessibility to the radical site is greatly diminished.

as shown from the crystal structure of the mutant protein obtained at 2.5-Å resolution. We exclude the possibility that the Leu77→Phe mutation might have affected the redox potential of the radical and thus the driving force of the reactions as an explanation for the increased radical reactivity, since the mutant protein behaved as wild-type R2 during the slow reaction with dithionite or ascorbate. For the same reason, we exclude the possibility that the mutation lowered the activation barrier for a long-range electron transfer from the surface of the protein to the radical. This further supports the notion that the hydrophobic environment of the radical, while required for its stability, may be a disadvantage when the active protein is challenged by hydrophobic drugs with reductant properties. The optimal radical pocket is thus not simply the more hydrophobic combination of residues but rather the solution providing the best balance between a good insulation of the radical (requiring hydrophobicity) and protection of the radical from small hydrophobic drugs. That the reaction is stimulated when both the hydrophobicity of the radical pocket and that of the scavenger are increased, may reflect that the latter actually penetrates into the interior of the former. The resulting hydrophobic interactions make the direct electron transfer more favorable. However, the X-ray structure of the [Phe77]R2 protein shows an increased occupancy of the radical pocket and a direct access of the scavenger to it requires that the flexibility of the protein in solution generates conformations in which the steric hindrance is diminished. However, the fact that the Leu→Phe mutation had no effect on the structural arrangement of the radical pocket, as shown from the X-ray three-dimensional structure of [Phe77]R2, indicates that this pocket affords enough free space for hosting additional molecules. More mutants are needed to support such an important conclusion.

Finally, an interesting observation was that introduction of a positive charge at position 74 (by changing isoleucine to either a lysine or an arginine) greatly accelerated the reaction of the tyrosyl radical with dithionite (Table 2), making a negatively charged electron donor a good tyrosyl-radical scavenger. Ascorbate activity was also improved. Furthermore, we found saturation effects for the reaction of dithionite with [Arg74]R2 or [Lys74]R2, for concentrations between 5 mM and 30 mM. This then suggests that the mutations have generated a saturable binding site for dithionite, with the binding energy mainly provided with electrostatic interactions between the positive charge introduced in the protein and the negatively charged substrate. This site is rather far from the radical and makes these mutant proteins interesting tools for studying electron transfers in ribonucleotide reductase protein R2.

Hydroxyurea is expected to be neutral at pH7.5. It was thus surprising to observe that the various mutations affected the reaction between the radical and hydroxyurea in the same way they affected the reaction with the negatively charged dithionite: hydroxyurea reactivity was larger in [Lys74]R2 and [Arg74]R2 than in wild-type R2 but not significantly changed in [Phe74]R2 and [Phe77]R2 with regard to wild-type R2. The stereoelectronic basis for this peculiarity is still unclear.

In conclusion, our results show that the reactivity of the tyrosyl radical can be finely tuned by relatively small modifications at its hydrophobic pocket. However, whether inhibitors penetrate into this pocket or give their electrons from the surface is still an open question. It is possible that reduction of the [Arg74]R2 or [Lys74]R2 proteins by dithionite is a system in which a long-range electron transfer is occurring and can be studied.

We are grateful to B.-M. Sjöberg, Department of Molecular Biology, Stockholm University, for providing us with the pTB2 plasmid. This

study was supported by grants from the *Centre National de Recherche Scientifique* (CNRS) and the *Université Joseph Fourier*.

## REFERENCES

- Reichard, P. (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**, 1773–1777.
- Fontecave, M., Nordlünd, P., Eklund, H. & Reichard, P. (1992) The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **65**, 147–183.
- Ehrenberg, A. & Reichard, P. (1972) Electron spin resonance of the iron-containing B2 from ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3485–3488.
- Nordlünd, P., Sjöberg, B.-M. & Eklund, H. (1990) The three dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* **345**, 593–598.
- Ormö, M., Regnström, K., Wang, Z., Que, L. Jr, Sahlin, M. & Sjöberg, B.-M. (1995) Residues important for radical stability in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 6570–6576.
- Regnström, K., Åberg, A., Ormö, M., Sahlin, M. & Sjöberg, B.-M. (1994) The conserved serine 211 is essential for reduction of the dinuclear iron center in protein R2 of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **269**, 6355–6361.
- Covès, J., Delon, B., Climent, I., Sjöberg, B.-M. & Fontecave, M. (1995) Enzymic and chemical reduction of the iron center of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *Eur. J. Biochem.* **233**, 357–363.
- Gerez, C. & Fontecave, M. (1992) Reduction of the small subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by hydrazines and hydroxylamines. *Biochemistry* **31**, 780–786.
- Atta, M., Lamarche, N., Battioni, J.-P., Massie, B., Langelier, Y., Mansuy, D. & Fontecave, M. (1993) *Escherichia coli* and Herpes-simplex-virus ribonucleotide reductase R2 subunit. Compared reactivities of the redox centres. *Biochem. J.* **290**, 807–810.
- Climent, I., Sjöberg, B.-M. & Hung, C. Y. (1992) Site directed mutagenesis and deletion of the carboxyl terminus of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *Biochemistry* **31**, 4801–4807.
- Fürste, J. P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. & Lanka, E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene (Amst.)* **48**, 119–131.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene (Amst.)* **77**, 51–59.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367–382.
- Sjöberg, B.-M., Hahne, S., Karlsson, M., Jörnvall, H., Göransson, M. & Uhlin, B. E. (1986) Overproduction and purification of the B2 subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**, 5658–5662.
- Bradford, M. M. (1976) 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.
- Atkin, C. L., Thelander, L., Reichard, P. & Lang, G. (1973) Iron and free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**, 7464–7472.
- Eliasson, R., Jörnvall, H. & Reichard, P. (1986) Superoxide dismutase participates in the enzymatic formation of the tyrosine radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 2373–2377.
- Nordlünd, P., Uhlin, U., Westergren, C., Joelsen, T., Sjöberg, B.-M. & Eklund, H. (1989) New crystal forms of the small subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **258**, 251–254.
- Otwinowski, Z. (1993) Data collection and processing, in *Proceedings of the CCP4 study weekend* (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds) pp. 56–62, SERC Daresbury Laboratory.
- Tronrud, D. E., Ten Eyck, L. & Matthews, B. N. (1989) An efficient general purpose least-squares refinement program for macromolecular structures. *Acta Crystallogr. Sect. A* **43**, 489–501.

21. Stubbe, J. (1990) Ribonucleotide reductases: amazing and confusing, *J. Biol. Chem.* *265*, 5329–5332.
22. Mao, S. S., Yu, G. X., Chalfoun, D. & Stubbe, J. (1992) Characterization of C439SR1, a mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase: evidence that C439 is a residue essential for nucleotide reduction and C439SR1 is a protein possessing novel thioredoxin-like activity, *Biochemistry* *31*, 9752–9759.
23. Silva, K. E., Elgren, T. E., Que, L. Jr & Stankovich, M. T. (1995) Electron transfer properties of the R2 protein of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* *34*, 14093–14103.
24. Sahlin, M., Gräslund, A., Petersson, L., Ehrenberg, A. & Sjöberg, B.-M. (1989) Reduced forms of the iron-containing small subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* *28*, 2618–2625.
25. Han, J.-Y., Swarts, J. C. & Sykes, A. G. (1996) Kinetic studies on the hydrazine and phenylhydrazine reductions of the *Escherichia coli* R2 subunit of ribonucleotide reductase, *Inorg. Chem.* *35*, 4629–4634.

# Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase

Marc Fontecave<sup>a,\*</sup>, Michel Lepoivre<sup>b</sup>, Eric Elleingand<sup>a</sup>, Catherine Gerez<sup>a</sup>, Olivier Guittet<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biologiques, DBMS-CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Bât. K, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

<sup>b</sup>ERS CNRS 571, Université Paris Sud, Bât. 430, 91405 Orsay Cedex, France

Received 17 November 1997; revised version received 9 December 1997

**Abstract** Resveratrol, a natural phytoalexin found in grapes, is well known for its presumed role in the prevention of heart disease, associated with red wine consumption. We show here that it is a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase and DNA synthesis in mammalian cells, which might have further applications as an antiproliferative or a cancer chemopreventive agent in humans.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

**Key words:** Resveratrol; Ribonucleotide reductase; Tyrosyl radical; Anticancer agent

## 1. Introduction

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a natural phytoalexin found in grapes (Scheme 1). Its physiological function is not well defined but is thought to reside in the protection of the plant from environmental stress and pathogenic attack [1]. On the other hand, it has been suggested to play a role in the prevention of heart disease, associated with red wine consumption, as it inhibits platelet aggregation, alters eicosanoid synthesis and modulates lipid and lipoprotein metabolism [1]. Resveratrol was also recently shown to inhibit cellular events associated with tumor initiation, promotion and progression [2]. In the light of its very weak toxicity, at least in mouse tumor models [2], it was suggested that resveratrol should be investigated as a cancer chemopreventive agent in humans.

Still very little is known about the molecular basis for its biological activities. As a polyphenol molecule, it is a radical scavenger and has been shown to inhibit cyclooxygenase activity [2]. Now we report that it is a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase, the enzyme which provides proliferating cells with deoxyribonucleotides required for DNA synthesis, during the early S-phase of the cell cycle [3]. This is likely to explain its antiproliferative properties.

Ribonucleotide reductases are complex enzymes which catalyze the reduction of ribonucleotides into the corresponding deoxyribonucleotides. Mammalian cells, in common with other eukaryotes, DNA viruses of the Herpesvirus group and some bacteria, notably *Escherichia coli*, have an iron-containing enzyme which consists of two non-identical homodimeric subunits, R1 and R2 [4]. Each protein represents an important target for new antiproliferative drugs [5]. Protein R1 contains the substrate binding sites and can be irreversibly inactivated by certain nucleotide analogs, in particular those having a modification at the 2' position of the ribose moiety [5–8]. For example, gemcitabine, the 2'-difluoro-2'-deoxycytidine

analog, proved to be an excellent ribonucleotide reductase inhibitor and is now used in clinics [7].

Another strategy of inhibition relies on the fact that enzyme activity depends on the presence of a tyrosyl radical on a specific residue of the small R2 protein [9]. Tyrosyl radical scavenging by hydroxyurea [10] or 4-hydroxyanisole [11], both used in clinics as anticancer agents, results in enzyme inactivation and inhibition of DNA synthesis. This strategy was recently revisited in the context of the research for new drugs against the human immunodeficiency virus (HIV), since a combination of hydroxyurea with 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) or 2',3'-dideoxyinosine (ddI) proved to have synergistic antiviral effects [12–14]. In view of the secondary effects of hydroxyurea and the development of cell resistance, due to the requirement for rather large doses of the drug, there is a need for new, more efficient inhibitors of ribonucleotide reductase. Resveratrol may be a good candidate.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Hydroxyurea and resveratrol were from Sigma; *p*-propoxyphenol was from Aldrich.

Recombinant mouse R2 protein was prepared as previously described [9] from an *E. coli* strain, BL21(DE3)-pETM2, containing the mouse R2 gene, kindly provided by Professor Thelander (University of Umeå, Sweden). After purification, the mouse R2 protein was obtained in the apoprotein form. The radical site was then generated after the anion exchange chromatography step by addition of ferrous iron/ascorbate (molar ratio 1:2) anaerobically followed by addition of oxygen [9]. The protein solution was transferred to ice and the excess iron/ascorbate complex was immediately removed by gel filtration on a Sephadex G25 column. The reconstituted protein was kept in 50 mM Tris pH 7.6, 10% glycerol, frozen in liquid nitrogen and stored at –70°C until used. Its concentration was determined with the Bradford colorimetric assay [15] or from the absorption at 280 nm ( $\epsilon_{280, 310} = 62000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [9].

### 2.2. Assay for tyrosyl radical scavenging – EPR spectroscopy

First derivative EPR spectra were recorded at 100 K on a Bruker ESP300E spectrometer. Protein R2 was dissolved in 150  $\mu\text{l}$  of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 in order to have a final protein-bound tyrosyl radical concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The solution was transferred to an electron paramagnetic resonance (EPR) tube and a control spectrum was recorded. After addition of a small volume of the radical scavenger solution, incubation was carried out aerobically in the EPR tube at 37°C and was stopped after 5 min by freezing the sample at liquid N<sub>2</sub> temperature. The relative amplitude of the characteristic tyrosyl radical  $g = 2.00$  doublet signal (normalized to 100% for the control) was used to measure the inactivation of R2 at various concentrations of the radical scavengers. Half-maximal inhibition values were used to compare the efficiency of the inhibitors. Recording conditions: microwave power 10 mW; modulation amplitude 3.12 G.

### 2.3. Cell lines

L1210-R2 murine lymphoblastic leukemia cells, in which expression of protein R2 has been amplified 15–20 times with regard to the parental L1210 cell line [16], was used for ribonucleotide reductase assays. K-562 human myelogenous leukemia cells and P-815 murine

\*Corresponding author. Fax: (33) (4) 76889124.  
E-mail: Fontecave@cebrb.ceca.fr

mastocytoma cells were used for assaying [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation into DNA. These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics, 5% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL Sarl, Cergy-Pontoise, France), and 25 mM HEPES pH 7.4.

#### 2.4. CDP reductase assay

The L1210-R2-overexpressing cell line [16] was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics and 5% heat-inactivated fetal calf serum. Cells grown in exponential phase were harvested, washed once in phosphate-buffered saline and resuspended in 100 mM HEPES pH 7.6, 15 mM magnesium acetate and 10 mM dithiothreitol (DTT), at a concentration of  $10^8$  cells/500  $\mu\text{l}$ . Preparation of cytosolic extracts and assay of ribonucleotide reductase were performed essentially as described in [17], except that CDP concentration was reduced to 80  $\mu\text{M}$ . Inhibitors were added with the CDP substrate, when required.

#### 2.5. Determination of [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation

K-562 human erythroleukemia cells and P-815 murine mastocytoma cells were seeded in 96-well microculture plates ( $1 \times 10^5$  cells/well) in 100  $\mu\text{l}$  culture medium. Inhibitors were added in 100  $\mu\text{l}$  and the cells were labelled with 37 kBq of [ $^3\text{H}$ ]thymidine (specific activity 37 GBq/mmol; Amersham, France) for 24 h at 37°C. DNA was then harvested on glass fiber filters and radioactivity determined by scintillation counting [17].

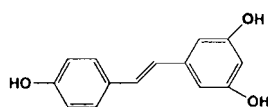
### 3. Results

#### 3.1. Reaction of the tyrosyl radical in protein R2 with resveratrol

The tyrosyl radical of pure recombinant protein R2 from mouse exhibits an EPR doublet at 100 K at  $g=2.0047$  and can thus be monitored during reaction with increasing concentrations of radical scavengers [11]. We found that the catalytically essential radical (10  $\mu\text{M}$ ) was totally destroyed in the presence of a stoichiometric amount of resveratrol after 5 min incubation at 37°C (Fig. 1). Resveratrol was thus much more active than hydroxyurea since 10  $\mu\text{M}$  hydroxyurea had almost no detectable effect on the tyrosyl radical after 5 min reaction (Fig. 1). Much higher concentrations or much longer reaction times were required for full destruction of the tyrosyl radical, as expected.

#### 3.2. Inhibition of ribonucleotide reductase activity by resveratrol

The ability of resveratrol to destroy the tyrosyl radical was correlated with its strong dose-dependent inhibitory effects on enzyme activity, as assayed in soluble extracts of murine leukemia cells containing high protein R2 expression and high cytidine diphosphate reductase activity suitable for sensitive and reproducible assays (Fig. 2). The  $\text{IC}_{50}$  value (100  $\mu\text{M}$ ) was much smaller than that of hydroxyurea (1 mM). The latter value was in the concentration range previously reported [18]. We also compared it to that of *p*-propoxyphenol, which was recently claimed to be one of the most potent phenol inhibitors of ribonucleotide reductase [11]. The latter was found to be significantly less active with a  $\text{IC}_{50}$  value of 300  $\mu\text{M}$ , under comparable conditions (Fig. 2). We thus expect an  $\text{IC}_{50}$  value



Scheme 1.

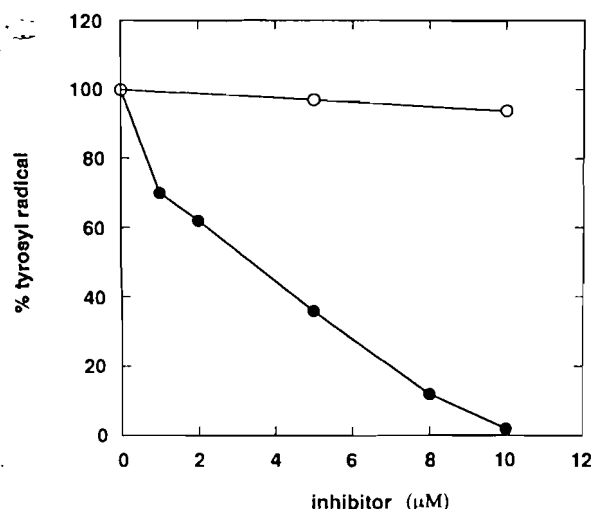


Fig. 1. Inactivation of the R2 protein of mouse ribonucleotide reductase by resveratrol and hydroxyurea. 10  $\mu\text{M}$  of mouse protein R2 tyrosyl radical was incubated with increased concentrations of resveratrol (●) and hydroxyurea (○) at 37°C for 5 min. The sample was then frozen and assayed for its radical content by EPR spectroscopy at 100 K.

much below 100  $\mu\text{M}$  in assays where R2 is more limiting, in normal cells.

#### 3.3. Inhibition of DNA synthesis by resveratrol

The antiproliferative properties of resveratrol and its inhibitory effects on DNA synthesis were evaluated from the [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation into DNA assay. For these experiments, we used both murine mastocytoma P-815 cells and human myelogenous leukemia K-562 cells and again compared resveratrol to hydroxyurea. Both cell lines gave comparable results with resveratrol being a much better inhibitor of DNA synthesis with a  $\text{IC}_{50}$  value of 8–10  $\mu\text{M}$  compared to a  $\text{IC}_{50}$  value of 250  $\mu\text{M}$  for hydroxyurea (Fig. 3). The  $\text{IC}_{50}$  values are significantly lower than those obtained in the CDP reductase assay described above. This reflects that the cells used here are not overexpressing R2.

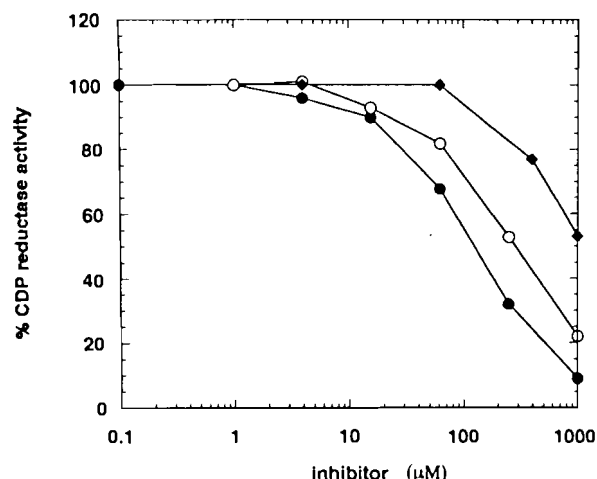


Fig. 2. Inhibition of mouse ribonucleotide reductase activity by resveratrol (●), hydroxyurea (◆) and *p*-propoxyphenol (○). 100% activity corresponded to 100 pmol/min/mg in the experiment with resveratrol and *p*-propoxyphenol and to 22 pmol/min/mg in the experiment with hydroxyurea.



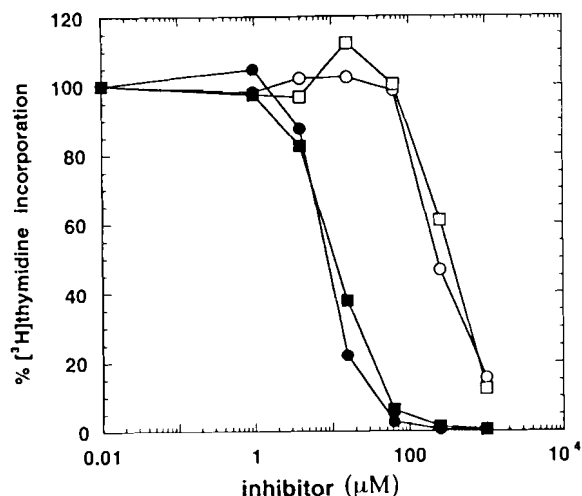


Fig. 3. Inhibition of DNA synthesis by resveratrol and hydroxyurea. K-562 (rounds) and P-815 (squares) tumor cells were incubated with resveratrol (closed symbols) or hydroxyurea (open symbols) and [ $^3\text{H}$ ]thymidine at 37°C for 24 h. DNA was then harvested on a glass filter and radioactivity determined by scintillation counting.

#### 4. Discussion

There is still a great interest in the development of inhibitors of ribonucleotide reductase as anticancer, antibacterial and antiviral drugs, including for therapeutic strategies against HIV [12-14,19]. The recent observation that resveratrol, a common constituent of the human diet, had cancer chemopreventive activity [2] and the well-established fact that ribonucleotide reductase is highly sensitive to phenol derivatives led us to investigate whether resveratrol was a good inhibitor of mammalian ribonucleotide reductase.

Our results show for the first time that indeed, at least *in vitro*, resveratrol is a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. It is much more effective than hydroxyurea, hydroxyanisole, the only ribonucleotide reductase tyrosyl radical scavengers used in clinics, and the potent *p*-propoxyphenol [11]. The most active radical scavenger described up to now acting on ribonucleotide reductase is 5-amino-1-formyl isoquinoline thiosemicarbazone [20,21]. However, thiosemicarbazones have no application as drugs, because of their very strong toxicity. We suggest that resveratrol should thus be considered as an alternative to the more toxic hydroxyurea, for example in studies of bitherapeutic approaches against HIV.

Furthermore, our results provide new insights into the beneficial biological activities of resveratrol. Resveratrol has in the recent past been a subject of intense research mainly because it may be one of the key components in red wine responsible for the prevention of heart disease [1]. Inhibition of cyclooxygenase might partly explain this effect [2]. Now we

confirm the strong antiproliferative properties of resveratrol and show that they are likely to be due to its ability to efficiently scavenge the essential tyrosyl radical of the small protein of ribonucleotide reductase and, consequently, to inhibit deoxyribonucleotide synthesis. Our data thus strongly support the suggestion that, in addition to its cardiovascular beneficial effects, resveratrol merits further investigation as a cancer chemopreventive agent in humans.

*Acknowledgements:* We are extremely grateful to Prof. L. Thelander, University of Umeå, Sweden, for providing us with the *E. coli* strain, BL21(DE3)-pETM2.

#### References

- [1] Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M. (1997) *Clin. Biochem.* 30, 91-113.
- [2] Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (1997) *Science* 275, 218-220.
- [3] Reichard, P. (1987) *Biochemistry* 26, 3245-3248.
- [4] Sjöberg, B.-M. (1995) in: *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Eds.), Vol. 9, pp. 192-221, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- [5] Stubbe, J. and van der Donk, W.A. (1995) *Chem. Biol.* 2, 793-801.
- [6] Robins, M.J., Samano, M.C. and Samano, V. (1995) *Nucleosides Nucleotides* 14, 485-493.
- [7] Abbruzzese, J.L. and Plunkett, W. et al. (1991) *J. Clin. Oncol.* 9, 491-498.
- [8] McCarthy, J.R. and Sunkara, P.S. (1995) in: *Chemical and Structural Approaches to Rational Drug Design* (Weiner, D.B. and Williams, W.B., Eds.), pp. 3-32, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [9] Mann, G.J., Gräslund, A., Ochiai, E.I., Ingemarson, R. and Thelander, L. (1991) *Biochemistry* 30, 1939-1947.
- [10] Kjöller-Larsen, I., Sjöberg, B.-M. and Thelander, L. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 75-81.
- [11] Pötsch, S., Drechsler, H., Liermann, B., Gräslund, A. and Lassmann, G. (1994) *Mol. Pharmacol.* 45, 792-796.
- [12] Gao, W.-Y., Cara, A., Gallo, R.C. and Lori, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8925-8928.
- [13] Lori, F., Malykh, A., Cara, A., Sun, D., Weinstein, J.N., Lisiewicz, J. and Gallo, R.C. (1994) *Science* 266, 801-805.
- [14] Gao, W.-Y., Johns, D.G., Choekijehai, S. and Mitsuya, H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8333-8337.
- [15] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [16] Lepoivre, M., Flaman, J.-M., Bobé, P., Lemaire, G. and Henry, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 21891-21897.
- [17] Lepoivre, M., Chenais, B., Yapo, A., Lemaire, G., Thelander, L. and Tenu, J.P. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14143-14149.
- [18] Elford, H.L., Wampler, G.L. and van't Riet, B. (1979) *Cancer Res.* 39, 844-851.
- [19] Bianchi, V., Borella, P., Alderazzo, F., Ferraro, P., Chieco Bianchi, L. and Reichard, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8403-8407.
- [20] Thelander, L. and Gräslund, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4063-4066.
- [21] Liermann, B., Lassmann, G. and Langen, P. (1990) *Free Radical Biol. Med.* 9, 1-4.

**The small protein of ribonucleotide reductase from  
*Mycobacterium tuberculosis*  
Comparison with *Escherichia coli*, mouse and *Arabidopsis thaliana*.**

Eric Elleingand<sup>1</sup>, Catherine Gerez<sup>1</sup>, Sun Un<sup>2,4</sup>, Moritz Knüpling<sup>2,3</sup>,  
Guizlen Lu<sup>5</sup>, Jerome Salem<sup>5</sup>, Harvey Rubin<sup>5</sup>, Sandrine Sauge-Merle<sup>1</sup>,  
Jean-Pierre Laulhère<sup>1</sup>, Marc Fontecave<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biologiques, DBMS-CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Bât. K, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

<sup>2</sup>Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Section de Bioénergétique, CNRS URA 2096, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup>Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin, D-14195 Berlin, Germany

<sup>4</sup>High Magnetic Field Laboratory, MPIF-CNRS, B.P. 166, F-38042 Grenoble Cedex France

<sup>5</sup>Infectious Disease Section, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

*Subdivision* : Protein chemistry and structure

*Correspondence to* M. Fontecave, Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biologiques, CEA, Bât. K, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel. 33 4 76 88 91 03. Fax 33 4 76 88 91 24

E-mail : fontecav@cbrb.ceng.cea.fr

*Abbreviations* : RNR, ribonucleotide reductase

*Enzymes* : Ribonucleoside-diphosphate reductase (EC 1.17.4.1)

## SUMMARY

Ribonucleotide reductase (RNR) is a key enzyme for DNA synthesis since it provides cells with deoxyribonucleotides, the DNA precursors. Class I  $\alpha 2\beta 2$  RNRs contain an essential tyrosyl radical in the  $\beta 2$  protein and are inhibited by radical scavengers. The tyrosyl radical from the purified  $\beta 2$  component of *Mycobacterium tuberculosis* RNR has been carefully studied by EPR spectroscopy both at 9,47 and 286 GHz and compared to those from *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana* and mouse RNR. Furthermore, it proved to be very resistant to scavenging by a variety of phenols and thiols and by hydroxyurea, much as the *E. coli* radical. On the contrary, the plant and mouse radicals are very sensitive to drugs such as resveratrol and 2-thiophenethiol. The radical from *M. tuberculosis* RNR does not seem to be an appropriate target for new antituberculous agents.

**Keywords :** Ribonucleotide reductase ; Tyrosyl radical ; *Mycobacterium tuberculosis* ; Radical scavengers ; EPR

## INTRODUCTION

Ribonucleotide reductases (RNRs) are complex enzymes which catalyze the reduction of ribonucleotides by NADPH and thus provide all living cells with the deoxyribonucleotides required for DNA synthesis and repair [1]. As a consequence, they are considered as important targets for antiproliferative drugs. Hydroxyurea and gemcitabine, 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine, a nucleoside analog, are inhibitors of RNRs and used as anticancer drugs [2,3].

Class I RNRs are divided into two subclasses Ia and Ib. Class Ia RNRs are found in eukaryotes, mammals or plants, several viruses, such as the *Herpes Simplex* viruses, a few prokaryotes and bacteriophages [4]. The class Ia prototype is the  $\alpha 2\beta 2$  enzyme from *Escherichia coli*, which has been fully characterized. Both the large and the small proteins, named R1 ( $\alpha 2$ ) and R2 ( $\beta 2$ ), have been crystallized and their three-dimensional structure determined at high resolution [5,6]. Protein R1 contains the binding sites for both substrates and allosteric effectors. Protein R2 contains a non heme diiron center, in which the ferric ions are linked by an oxo bridge, on each polypeptide chain. The X-ray structure shows that the metal center is deeply buried within the protein and that a tyrosine residue (Tyr 122) is about 5 Å away from the closest Fe atom. In the active enzyme this tyrosine is in fact a tyrosyl radical, as shown from a variety of spectroscopic studies and from site-directed mutagenesis [7,8]. Tyrosyl radical scavenging, by hydroxyurea for example, results in enzyme inactivation and inhibition of DNA synthesis [3,9].

Class Ib RNRs are also  $\alpha_2\beta_2$  enzymes, found in bacteria, such as *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis* [10,11,12,13]. A class Ib enzyme is also found in *E. coli* but is not expressed in sufficient amount to support growth under normal laboratory conditions [14]. *M. tuberculosis* is the only organism whose growth has been shown to depend on an active expressed class Ib enzyme, so far. These RNRs are closely related to class Ia enzymes, with similar Fe-radical center and homologous amino acid sequences except for the lack of the first 50 amino-acid N-terminal residues in the large  $\alpha_2$  (protein R1) subunit. Also, differences have been observed as far as the allosteric regulation of ribonucleotide reduction is concerned [15]. It has also been shown that while class Ia RNRs can use thioredoxin to shuttle electrons from NADPH to the reductase class Ib RNRs cannot. A specific electron transporter, a new redoxin, has been discovered within the class Ib RNR operon of *L. lactis*. [10].

Recently new ribonucleotide reductases were cloned, expressed and isolated as pure and active recombinant proteins. In particular, for the first time the radical-containing protein R2 from the plant *Arabidopsis thaliana* [16] and from *Mycobacterium tuberculosis* [13] became available in our laboratories. Here we report the first detailed spectroscopic characterization of the tyrosyl radical of the class Ib R2 protein from *M. tuberculosis*.

As part of our program to understand the reactivity of protein-bound tyrosyl radicals [17,18,19], especially those in ribonucleotide reductases, we studied the plant and the *M. tuberculosis* R2 radicals and compared them to mouse and *E. coli* R2 radicals, in terms of their reactivity with regard to a variety of radical scavengers, hydroxyurea, substituted phenols and thiols. While mouse and *E. coli* R2s have been extensively investigated as prototypes for eukaryotic and bacterial enzymes, respectively, nothing was known on the reactivity of the plant and *M. tuberculosis* RNRs. This investigation was aimed at finding classes of compounds that might selectively scavenge a given radical, thus showing selective inhibitory effects on the corresponding RNR and, as a consequence, on the growth of the corresponding organism. This would be particularly interesting in the case of *M. tuberculosis*, the infectious agent responsible for tuberculosis, since drug-resistant tuberculosis requires new approaches to the development of antituberculous therapy. This is also interesting in the case of *A. thaliana*, since it may give rise to new drugs for selective inhibition of plant growth (herbicide).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Hydroxyurea and resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) were from Sigma ; 2-thiophenthiol was from Fluka and other chemical scavengers were from Aldrich.

*E. coli* protein R2 was purified from an overproducing strain as previously described [19,20].

Recombinant mouse R2 protein was prepared as previously described [21] from an *E. coli* strain, BL21(DE3)-pETM2, containing the mouse R2 gene, kindly provided by Professor Thelander (University of Umeå, Sweden). After purification, the mouse R2 protein was obtained in the apoprotein form. The radical site was then generated after the anion-exchange chromatography step by addition of ferrous iron/ascorbate (molar ratio 1:2) anaerobically followed by addition of oxygen [21]. The protein solution was transferred to ice and the excess of the iron/ascorbate complex was immediately removed by gel filtration on a Sephadex G25 column. The reconstituted protein was kept in 50 mM Tris pH 7.6, 10% glycerol, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C.

Recombinant *A. thaliana* R2 protein was overexpressed and purified in the apoprotein form as previously described [16]. The iron/radical site was then reconstituted anaerobically by addition of 8 equivalents of ferrous iron and 80 equivalents of ascorbate, followed by addition of oxygen [16]. Iron excess was removed on a Sephadex G25 column.

Recombinant *M. tuberculosis* R2 was obtained according to the procedure described elsewhere [13] except that we added a gel filtration step after the ion-exchange chromatography on DE52. The fractions containing protein R2 were pooled, concentrated and dialyzed before loaded onto a Superdex 75, 16/60 (Pharmacia Biotech Inc.) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.1 M KCl. After 40 ml had passed through the column, fractions (1 ml) were collected and the ones containing protein R2 were pooled and concentrated by centrifugation on a Centricon-30 microconcentrator. The protein solution was aliquoted and stored at -70°C.

Protein concentrations were determined with the Bradford colorimetric assay [22]. Iron content was determined as described by Fish [23].

### Spectroscopic measurements

The *M. tuberculosis* R2 protein was analysed by UV-visible spectroscopy using a UVIKON 930 spectrophotometer.

The X-band EPR spectra of all R2 proteins were obtained at 100K with a Bruker ESP 300 E spectrometer.

Tyrosyl radical contents were determined by comparison of double integrals of the characteristic EPR spectra with that of a calibrated sample of pure *E. coli* protein R2.

High-field EPR spectra (286 GHz) were recorded at 4K. The spectra from *E. coli* R2 and *A. thaliana* R2 were obtained using the high-field EPR spectrometer at the Grenoble High Magnetic Field Laboratory. The spectrum from *M. tuberculosis* R2 was obtained using a recently built spectrometer at CEA Saclay which will be described in a future publication. The absolute accuracy of the g-values are about  $\pm 2 \times 10^{-4}$  and relative accuracy is estimated to be  $\pm 2 \times 10^{-5}$ . All spectra were collected under non-saturating conditions. The spectra were simulated using a g-tensor, only model and no hyperfine interactions were explicitly included. The spectra were fitted using a standard conjugate gradient techniques [24]. The fitting parameters were the three principal g-values and a single inhomogeneous linewidth.

### **Assay for tyrosyl radical scavenging. EPR spectroscopy**

Protein R2 was dissolved in 150  $\mu$ l of 0.1 M Tris/HCl buffer pH 7.5 in order to have a final protein-bound tyrosyl radical concentration of 10  $\mu$ M. The solution was transferred to an EPR tube and a control spectrum was recorded. After addition of a small volume of the radical scavenger solution, incubation was carried out aerobically in the EPR tube at 37°C and was stopped after 10 min by freezing the sample at liquid N<sub>2</sub> temperature. The relative amplitude of the characteristic tyrosyl radical g = 2.00 doublet signal (normalized to 100 % for the control) was used to measure the inactivation of R2 at concentrations of 1 or 0.1 mM of the radical scavengers. Recording conditions : modulation amplitude 3.12 G ; microwave power 10 mW (*E. coli*, mouse, *A. thaliana*) or 0.3 mW (*M. tuberculosis*).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein R2.**

Protein R2 from *E. coli* (R2ec), *A. thaliana* (R2at), mouse (R2m) and *M. tuberculosis* (R2mt) were purified to homogeneity according to published procedures. The presence of a protein tyrosyl radical was shown from the characteristic signal at g = 2 in the EPR spectrum recorded at 100 K. In fact there are significant differences in EPR spectra for different tyrosyl radicals, both in terms of the hyperfine structure and in terms of the microwave power saturation

---

properties of the signal. As the spin distribution is a relatively constant parameter from one radical to another [25], the differences in hyperfine structure are mainly attributed to differences in the dihedral angle arrangements for the  $\beta$  methylene protons relative to the phenyl ring of the side chain [26]. The differences in microwave saturation behavior are attributed to differences in the magnetic interaction between the radical and the iron center [27]. While proteins R2ec, R2at and R2m had been extensively characterized, much less was known on protein R2mt, which thus needed to be investigated further.

The Ultra-Violet-visible spectrum of protein R2mt displays one broad well-defined light absorption band at 370 nm and a peak at 408 nm and is similar to spectra of other R2 proteins (Figure 1). The peak is due to the presence of the tyrosyl radical in the isolated protein and the Ultra-Violet band is typical for oxo-to-iron charge transfer transitions, demonstrating that protein R2mt contains a diiron center in which the two ferric ions are linked by an oxo bridge, comparable to the iron center in other R2 proteins. The oxo bridge is responsible for an antiferromagnetic coupling between the two iron atoms and for the lack of an Fe-dependent EPR signal. In agreement with this interpretation the protein was found to contain significant amounts of iron. However, iron was substoichiometric with regard to the protein (1.5-2 Fe per dimer).

The EPR spectrum of the pure protein at 100 K is shown in Figure 2. It has a g value of 2.0056 and is remarkably similar to that observed for the YD tyrosyl radical of photosystem II [25] and to that of the tyrosyl radical of another class Ib protein R2, isolated from *Salmonella typhimurium* [28,29]. This similarity indicates that the  $\beta$ -methylene protons of the tyrosine side chain are situated with dihedral angles of about  $50^\circ$  and  $70^\circ$  with respect to the pz orbital on the aromatic ring as in photosystem II or *S. typhimurium*. The angles are  $30^\circ$  and  $90^\circ$  in *E. coli* R2 instead. From the intensity of the signal, it was possible to determine that protein R2mt preparations did not contain more than 0.4 radical per dimer. This radical was remarkably stable since no decay of the characteristic EPR signal could be observed after one hour incubation of the protein in buffer at  $37^\circ\text{C}$ .

The effect of increasing the microwave power on the EPR signal amplitude at 100 K was investigated. A  $P_{1/2}$  value of 1 mW was obtained,  $P_{1/2}$  being the microwave power resulting in a saturation factor of 2 (data not shown). This parameter is suitable for comparison with other tyrosyl radicals. We show here that saturation occurs at a much lower applied microwave power than in protein R2ec (14 mW at 100 K). Radicals from proteins R2at and R2m are even much

more difficult to saturate [16,27]. Altogether, this reflects a much weaker magnetic interaction between the radical and the iron center and a much larger iron-radical distance in the case of protein R2mt than in any other protein R2 reported so far. It seems that the radical of R2mt has the purest organic free radical character amongst characterized protein tyrosyl radicals and must be monitored only at very low microwave power.

The radical was also studied at high (286 GHz) EPR microwave frequency at 4 K (Figure 3). As expected, the high-field EPR spectrum is dominated by the g-value anisotropy of the radical [29,30]. The spectrum shows a rhombic Zeeman powder pattern and simulation of it gave the following parameters  $g_x = 2.0092$ ;  $g_y = 2.0046$ ;  $g_z = 2.0022$  with a  $g_{av}$  value of 2.0056. The  $g_x$  value is comparable to that found for protein R2ec [30] and *S. typhimurium* protein R2 [29,31] but significantly higher than that of protein R2at [16] and R2m [30] and of the  $Y_D$  radical of PSII [30] (Figure 3 and table 1). The  $g_x$  values of tyrosyl and semiquinone radicals have been shown to be very sensitive to the local electrostatic environment [30,32]. In principle, the electrostatic contributions from hydrogen bonds, ionized amino-acids and other charged centers can be detected. Using the known R2ec structure, we have previously shown that the overall net local electrostatic environment about the R2ec tyrosyl radical is likely to be slightly positive. The positive charge of the two iron ions is offset by the negatively charged ligands. This nearly neutral electrostatic environment leads to a  $g_x$  value of 2.0089. This value is consistent with molecular orbital g-values calculations for a tyrosyl radical in a slightly electropositive environment. By contrast, the stable tyrosyl radical in photosystem II has a  $g_x$  value of 2.0074 resulting from the relatively electropositive influence of a hydrogen-bond donor. The higher  $g_x$  value of 2.0092 for the R2mt tyrosyl radical clearly indicates that this radical is not hydrogen bonded [31] and exists in a more electronegative environment than the R2ec radical. This conclusion is consistent with the relaxation data described above. If the weaker R2mt radical-metal magnetic interaction is due to a longer iron-radical distance than in the R2ec, this necessarily implies that electrostatic influence of the iron center must also be weaker and therefore would lead to a higher  $g_x$  value. Alternatively, a negatively charged residue may be present or nearer in the R2mt protein, leading to the higher g-value. Such a situation could also lead to modifications in the magnetic interactions.

**Compared reactivities of the tyrosyl radicals from *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, mouse and *Mycobacterium tuberculosis*.**



In order to investigate the reactivity of the various tyrosyl radicals, we selected a number of radical scavengers, shown in Figure 4. Hydroxyurea is a well-known inhibitor of ribonucleotide reductase and is used as an anticancer agent [2]. Phenylhydrazine was previously shown to be much better than hydroxyurea as a scavenger for the tyrosyl radical from protein R2ec [18]. Phenols are good tyrosyl radical scavengers [17,19,33]. By incorporating various substituents at the ortho, meta and para positions it is possible to modify the steric and electronic properties of the scavengers and to study how they affect the reactivity of the inhibitors with regard to the tyrosyl radical [17,19]. We included paracetamol and resveratrol. The latter compound, a natural phytoalexin found in grapes and presumably involved in the prevention of cardiovascular diseases associated with red wine consumption, was recently shown to be a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase and DNA synthesis in mammalian cells [34]. In this study we also included, for the first time, two thiol compounds, 2-thiophenethiol and furfuryl mercaptan, which were recently found to possess strong radical scavenging properties [35]. The former was more efficient, probably as a consequence of the presence of an aromatic thiol.

The reduction of the tyrosyl radical was monitored by EPR spectroscopy. The amount of radical can be easily determined from the amplitude of its characteristic EPR signal at  $g = 2.00$  at liquid  $N_2$  temperature. The results are presented in table 2 in terms of the amount of radical remaining after 10 min reaction of  $10 \mu M$  tyrosyl radical with the indicated concentration of radical scavenger at  $37^\circ C$ . In the case of paracetamol, resveratrol and 2-thiophenethiol which proved to be extremely efficient on proteins R2at and R2m, selectively, a scavenger concentration dependence of their reaction with both radicals is reported in Figure 5.

From table 2, several conclusions can be raised up. First, it is clear that both prokaryotic tyrosyl radicals are much more resistant to most of the radical scavengers tested here, hydroxyurea, phenols or thiols, than the eukaryotic ones with the only exception of phenylhydrazine. This was already established in the case of the *E. coli* radical [36], but is now also shown for the first time in the case of the *M. tuberculosis* one. The latter was even slightly more resistant to hydroxyurea than the former. This is unfortunate since these preliminary data seem to show that the tyrosyl radical of the small subunit of the ribonucleotide reductase from *M. tuberculosis* is not a good target for antituberculous agents. The strong differences between prokaryotic and eukaryotic radicals are more probably related to differences in reaction kinetics than in the thermodynamic driving force for the reduction of the radical. Actually, even though the exact redox potential of the radicals are difficult to determine, it is likely to be in the 0.5-1 V

---

range, thus much larger than the redox potentials of the scavengers. The origin and the reason for the greater stereoelectronic protection of the bacterial radicals remain to be understood.

Second, even though prokaryotic class I reductases have been divided into class Ia, represented here by the *E. coli* enzyme, and class Ib, represented by the *M. tuberculosis* one, class Ia and class Ib radicals are shown here for the first time to have highly comparable reactivities with regard to radical scavengers. In fact this is not surprising since most of the differences (aminoacid sequences and allosteric regulation mechanism) between class Ia and class Ib enzymes are related to the large R1 subunit [4,15].

Third, a preliminary study concluded that the reactivity of protein R2at was comparable to that of protein R2ec, on the basis of the kinetics of radical scavenging by hydroxyurea [16]. In fact, it is shown here that this is not true. The R2at radical behaves much as that of R2m, as clearly shown from its high sensitivity to paracetamol, 2-thiophenethiol and resveratrol (Figure 5). Considering this sensitivity, one may hope to find efficient scavengers against the plant radical. However, they have to be much more selective than those tested here so that they have a limited effect on mammalian ribonucleotide reductase.

Fourth, as recently shown, resveratrol is a remarkable inhibitor of eukaryotic ribonucleotide reductases [34]. Here we show that it is also the case with protein R2at. It would be thus interesting to study whether resveratrol, in plants, might play a role in the regulation of ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. Furthermore, 2-thiophenethiol, a compound which had not been previously studied as an inhibitor of RNR, is also an interesting radical scavenger which deserves further investigation. Its strong activity probably resides in the presence of an aromatic thiol group since a related analog furfuryl mercaptan, containing an aliphatic thiol group, was much less efficient. This is in agreement with model radical scavenging reactions [35].

## CONCLUSION

The small protein of ribonucleotide reductase from *M. tuberculosis* contains a common diiron-radical center. The EPR properties of the tyrosyl radical indicate that it is not hydrogen bonded, as in *E. coli* R2. On the other hand, the hyperfine structure of the signal reveals a conformation most similar to that of *S. typhimurium* and the radical of photosystem II. The tyrosyl radical from *M. tuberculosis* R2 protein shows a large resistance to radical scavengers, making it

an unsuitable target for selective antituberculous drugs. On the contrary the tyrosyl radical of *A. thaliana* protein R2 is very efficiently destroyed by resveratrol and 2-thiophenethiol, most as the radical of mouse R2.

It is interesting to observe that tyrosyl radicals in RNRs can be divided in two groups. The first one contains the prokaryotic, highly microwave power saturable, non hydrogen bonded and highly protected radicals. The second contains the eukaryotic less saturable, hydrogen bonded and highly sensitive radicals. As far as the radical is concerned, there are more differences between these two groups than between class Ia and class Ib RNRs, a classification recently proposed [4].

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from the Human Frontiers Science Organization. M. K. acknowledges the CEA for a doctoral fellowship.

## REFERENCES

1. Reichard, P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 349-374.
2. Colleen Moore, E. & Hurlbert, R.B. (1985) The inhibition of ribonucleotide reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole. *Pharmac. Ther.* 27, 167-196.
3. Baker, C.H., Banzon, J., Bollinger, J.M., Stubbe, J., Samano, V., Robins, M.J. et al. (1991) 2'-deoxy-2'-methylencytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J. Med. Chem.* 34, 1879-1884.
4. Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends in Biochem. Sci.* 22, 81-85.
5. Nordlund, P., Sjöberg, B-M. & Eklund, H. (1990) Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345, 593-598.
6. Uhlin, U. & Eklund, H. (1994) Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 370, 533-539.
7. Larsson, Å. & Sjöberg, B-M. (1986) Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. *EMBO J.* 5, 2037-2040.
8. Sjöberg, B-M., Reichard, P., Gräslund, A. & Ehrenberg, A. (1978) The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 6863-6865.

9. Lassman, G., Thelander, L. & Gräslund, A. (1992) EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188(2), 879-887.
10. Jordan, A., Pontis, E., Aslund, F., Hellman, U., Gibert, I. & Reichard, P. (1996) The ribonucleotide reductase system from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 271, 8779-8785.
11. Jordan, A., Gibert, I. & Barbé, J. (1994) Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* 176, 3420-3427.
12. Yang, F., Lu, G. & Rubin, H. (1994) Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression and purification of the large subunit. *J. Bacteriol.* 176, 6738-6743.
13. Yang, F., Curran, SC, Li, L., Avarbock, D., Graf, JD., Chua, M., Ku, G., Salem, J. & Rubin, H. (1997) Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. *J. Bacteriol.* 179, 6408-6415.
14. Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. & Barbé, J. (1996) Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* 19, 777-790.
15. Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A. & Reichard, P. (1996) Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (*NrdEF* enzyme) from *enterobacteriaceae*. *J. Biol. Chem.* 271, 26582-26587.
16. Sauge-Merle, S., Laulhère, J.P., Covès, J., Le Pape, L., Ménage, S. & Fontecave, M. (1997) Ribonucleotide reductase from the higher plant *Arabidopsis thaliana* : expression of the R2 component and characterization of its iron-radical center. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2, 586-594.
17. Atta, M., Lamarche, N., Battioni, J.P., Massie, B., Langelier, Y., Mansuy, D. & Fontecave, M. (1993) *Escherichia coli* and herpes-simplex-virus ribonucleotide reductase R2 subunit. *Biochem. J.* 290, 807-810.
18. Gerez, C. & Fontecave, M. (1992) Reduction of the small subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by hydrazines and hydroxylamines. *Biochemistry* 31, 780-786.
19. Gerez, C., Elleingand, E., Kauppi, B., Eklund, H. & Fontecave, M. (1997) Reactivity of the tyrosyl radical of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Control by the protein. *Eur. J. Biochem.* 249, 401-407.
20. Sjöberg, B.-M., Hahne, S., Karlsson, M., Jörnvall, H., Göransson, M. & Uhlin, B. E. (1986) Overproduction and purification of the B2 subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261, 5658-5662.

21. Mann, G.J., Gräslund, A., Ochiai, E.I., Ingemarson, R. & Thelander, L. (1991) Purification and characterization of recombinant mouse and herpes simplex virus ribonucleotide reductase R2 subunit. *Biochemistry* 30, 1939-1947.
  22. Bradford, M.M. (1976) 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.
  23. Fish, W.W. (1988) *Meth. Enzymol.* 158, 357-364.
  24. Press, W.H., Flannery, B. P., Tenkolski, S. A. & Vetterling, W. T. (1989) *Numerical recipes (FORTRAN version)*, Cambridge University Press, Cambridge.
  25. Hoganson, C.W., Sahlin, M., Sjöberg, B-M. & Babcock, G.T. (1996) Electron magnetic resonance of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 4672-4679.
  26. Barry, B.A., El-Deeb, M.K., Sandusky, P.O. & Babcock, G.T. (1990) Tyrosine radicals in photosystem II and related model compounds. *J. Biol. Chem.* 265, 20139-20143.
  27. Sahlin, M., Petersson, L., Gräslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B-M. & Thelander, L. (1987) Magnetic interaction between the tyrosyl free radical and the antiferromagnetically coupled iron center in ribonucleotide reductase. *Biochemistry* 26, 5541-5548.
  28. Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbé, J. & Reichard, P. (1994) A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12892-12896.
  29. Allard, P., Barra, A.L., Andersson, K.K., Schmidt, P.P., Atta, M. & Gräslund, A. (1996) Characterization of a new tyrosyl free radical in *Salmonella typhimurium* ribonucleotide reductase with EPR at 9.45 and 245 GHz. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 895-896.
  30. Un, S., Atta, M., Fontecave, M. & Rutherford, W. (1995) *g*-Values as a probe of the local protein environment: high-field EPR of tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase and photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10713-10719.
  31. Schmidt, P.P., Andersson, K.K., Barra, A-L., Thelander, L. & Gräslund, A. (1996) High field EPR studies of mouse ribonucleotide reductase indicate hydrogen bonding of the tyrosyl radical. *J. Biol. Chem.* 271, 23615-23618.
  32. Knüpling, M., Topping, J.T. & Un, S. (1997) The relationship between the molecular structure of semiquinone radicals and their *g* values. *Chem. Phys.* 219, 291-304.
  33. Pötsch, S., Sahlin, M., Langelier, Y., Gräslund, A. & Lassmann, G. (1995) Reduction of the tyrosyl radical and the iron center in protein R2 of ribonucleotide reductase from mouse, herpes simplex virus and *E. coli* by *p*-alkoxyphenols. *FEBS Lett.* 374, 95-99.
  34. Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C. & Guittet, O. (1998) Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* 421, 277-279.
-

35. Eiserich, J.P., Wong, J.W. & Shibamoto, T. (1995) Antioxidative activities of furan- and thiophenethiols measured in lipid peroxidation systems and by tyrosyl radical scavenging assay. *J. Agric. Food Chem.* 43, 647-650.
36. Kjöllér-Larsen, I., Sjöberg, B-M. & Thelander, L. (1982) Characterization of the active site of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, bacteriophage T4 and mammalian cells by inhibition studies with hydroxyurea analogues. *Eur. J. Biochem.* 125, 875-881.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1 : Light absorption spectrum of *M. tuberculosis* protein R2.** 13  $\mu\text{M}$  R2mt is in 50 mM Tris/HCl pH 7.6.

**Figure 2 : X-band EPR spectrum of *M. tuberculosis* protein R2 (25  $\mu\text{M}$ ).** EPR recording parameters are : temperature 100K ; microwave power 0.3 mW ; microwave frequency 9, 47 Ghz ; modulation amplitude 3,12 G.

**Figure 3 : High-field EPR spectra of R2 proteins.** (a) *M. tuberculosis* R2. The simulation spectrum is also indicated. (b) *E. coli* R2. (c) *A. thaliana* R2. EPR recording parameters are : temperature 4K ; microwave power ; microwave frequency 286 GHz ; modulation amplitude.

**Figure 4 : Radical scavengers.**

**Figure 5 : Compared reactivities of the tyrosyl radicals from mouse and *A. thaliana*.** 10  $\mu\text{M}$  R2m (closed symbols) or R2at tyrosyl radical (open symbols) tyrosyl radical were incubated with increased concentrations of resveratrol (circles), 2-thiophenethiol (squares) and paracetamol (triangles) at 37°C in 50 mM Tris-Cl pH 7.6, for 5 min. The sample was then frozen and assayed for its radical content by EPR spectroscopy at 100 K.

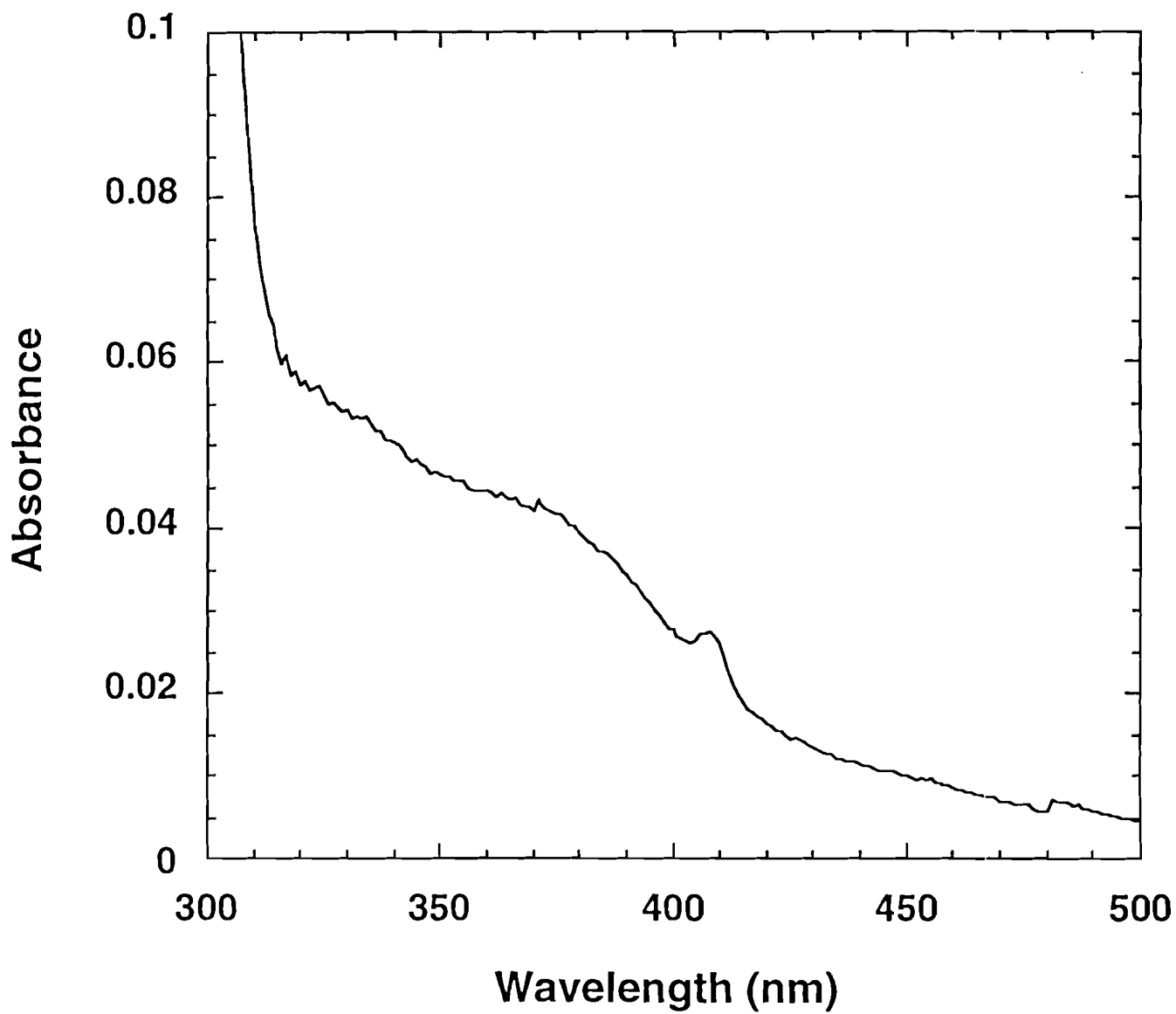


fig 1

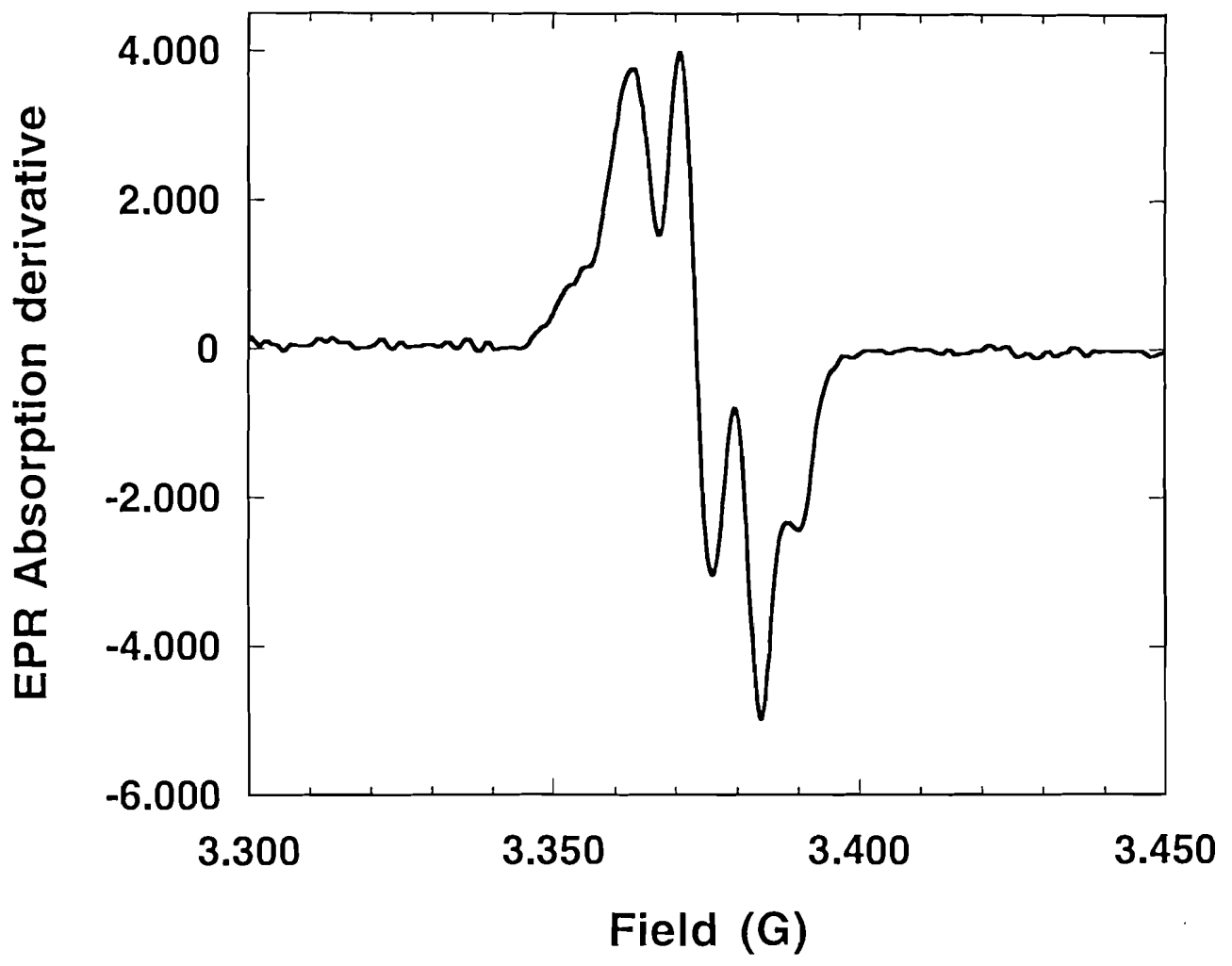


fig 2



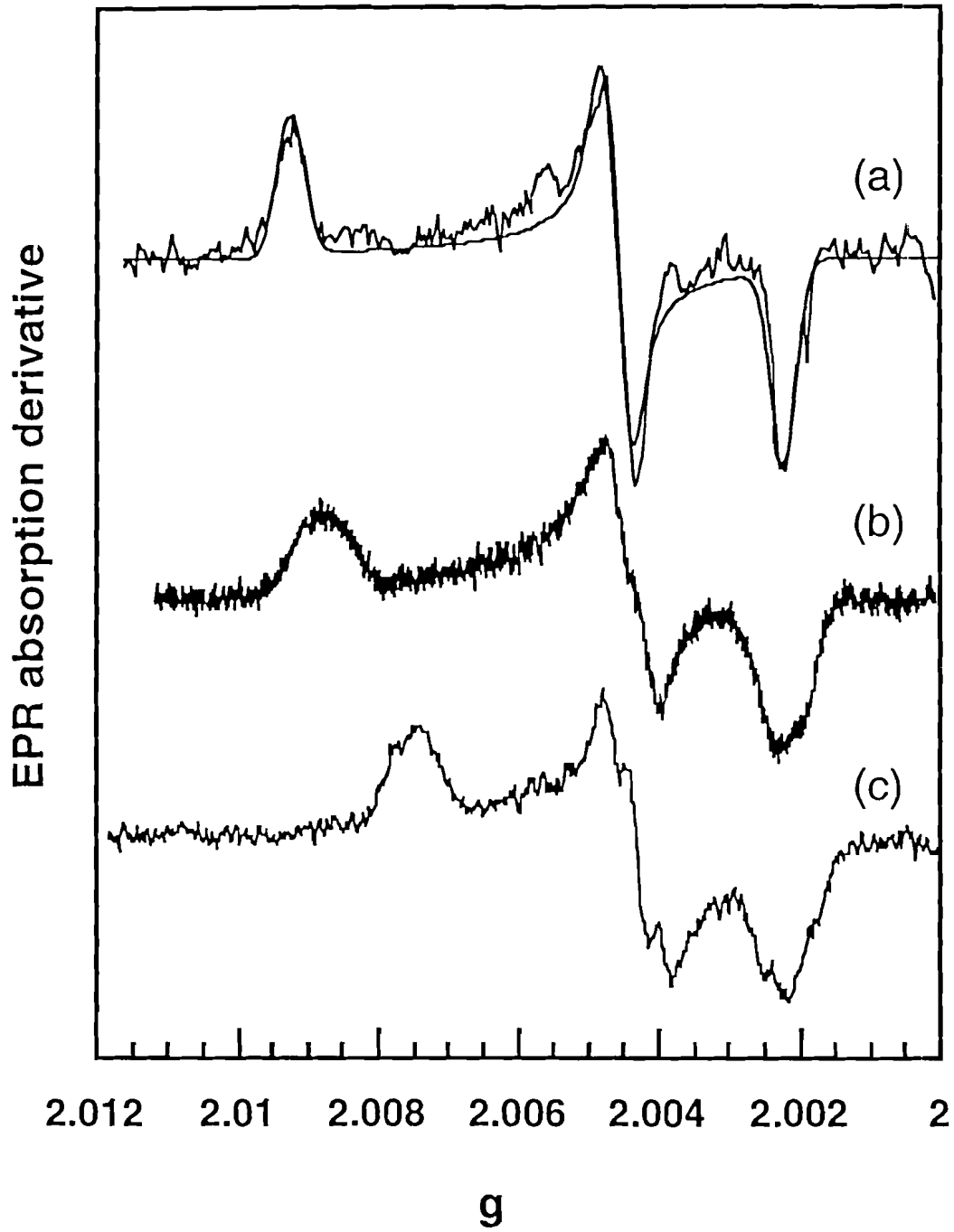
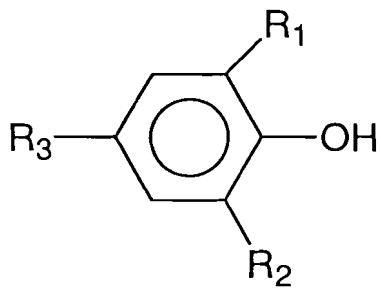


fig. 3

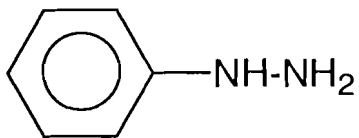


$R_1 = R_2 = R_3 = H$       **Phenol**

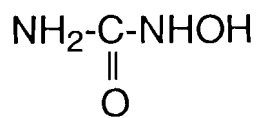
$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$       **2,4,6-Trimethylphenol**

$\left\{ \begin{array}{l} R_1 = R_2 = H \\ R_3 = CH_3-CO-NH \end{array} \right.$       **Paracetamol**

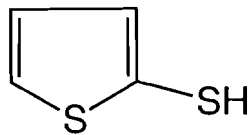
$\left\{ \begin{array}{l} R_1 = R_2 = H \\ R_3 = \text{[Structure of Resveratrol side chain]} \end{array} \right.$       **Resveratrol**



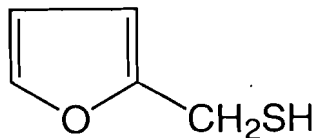
**Phenylhydrazine**



**Hydroxyurea**



**2-Thiophenethiol**



**Furfuryl mercaptan**

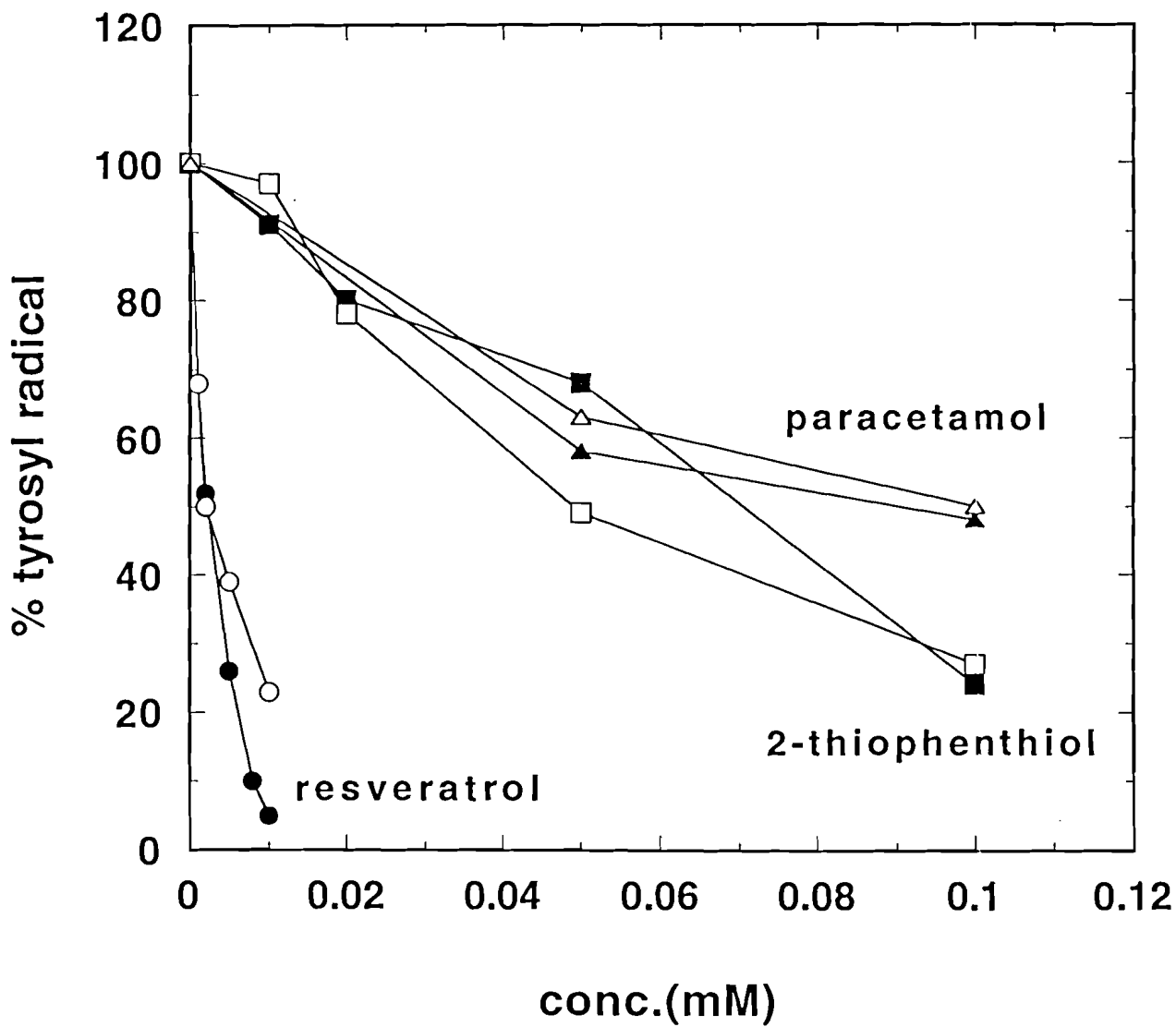


fig. 5

Table 1 : Selected values of the  $g_x$  component for tyrosyl radicals

<i>Tyrosyl radical source</i>	<i><math>g_x</math> value</i>	<i>References</i>
RNR-R2 <i>E.coli</i>	2.0089	This work
RNR-R2 <i>M. tuberculosis</i>	2.0092	This work
RNR-R2 <i>S. typhimurium</i>	2.0090	28,30
RNR-R2 mouse	2.0076	30
RNR-R2 <i>A. thaliana</i>	2.0075	This work
PSII (Y <sub>D</sub> )	2.0074	29

**Table 2 :** Compared reactivities of tyrosyl radicals from *E. coli*, *A. thaliana*, mouse and *M. tuberculosis*. Assays were carried out as described in Materials and Methods. The remaining EPR amplitude varies from 100 (no scavenging of the radical) to 0 (total scavenging of the radical). The incubation time was 10 min.

<i>Compounds</i>	<i>Conc.</i> (mM)	<i>Remaining EPR amplitude of</i>			
		R2ec	R2at	R2m	R2mt
		%			
Phenol	1	81	3	30	80
2,4,6-Trimethylphenol	0.1	87	34	37	85
Paracetamol	1	89	3	0	100
	0.1	100	32	46	100
Resveratrol	0.1	90	0	0	89
Furfuryl mercaptan	1	89	47	50	95
2-Thiophenthiol	1	66	0	0	46
	0.1		14	1	
Phenylhydrazine	1	37	15	0	0
Hydroxyurea	1	41	39	38	84



COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE GRENOBLE

UST/EC/PMC/REPROGRAPHIE/1998



## RESUME

La ribonucléotide réductase (RNR) est une enzyme clef qui catalyse la synthèse des désoxyribonucléotides, précurseurs de la synthèse de l'ADN. La petite sous-unité de la RNR de classe I, nommée R2, contient un radical tyrosinyle essentiel pour son activité. Par conséquent les piègeurs de radicaux sont de potentiels agents anti-prolifératifs. La structure tridimensionnelle de R2 montre que le radical tyrosinyle est enfoui à l'intérieur de la protéine. Dans cette thèse nous avons montré à l'aide de mutants dirigés de R2, que la réactivité de ce radical vis à vis des phénols, hydrazines, dithionite, hydroxyurée et ascorbate peut être changée par de petites modifications au niveau de l'environnement hydrophobe du site radicalaire. Quand par exemple une charge positive est introduite (mutant I74K ou I74R), la protéine devient plus sensible vis à vis des donneurs d'électrons anioniques tels que le dithionite ou l'ascorbate, un site d'affinité pour ces réducteurs anioniques est créé par ces mutations. La mutation de la leucine 77, proche du radical tyrosinyle, en phénylalanine, entraîne une hausse de la réactivité du radical tyrosinyle de la protéine R2 vis à vis des molécules chimiques possédant un noyau aromatique.

Ces résultats laissent penser que de petites molécules chimiques sont capables d'accéder au site radicalaire puisqu'elles sont capables d'interagir avec les résidus aminés de son environnement. Néanmoins, un mécanisme de transfert d'électrons indirect à longue distance ne peut être complètement exclu dans l'état actuel de ces résultats.

Les protéines R2 de nouvelles RNRs de classe I, celles de *M. tuberculosis* et *P. falciparum* ont été purifiées. La protéine R2 de *M. tuberculosis* a été caractérisée par des méthodes spectroscopiques telles que la RPE à bas et haut champ. La réactivité de son radical tyrosinyle vis à vis d'une série de piègeurs de radicaux a été examinée et comparée à celle des radicaux tyrosinyles d'autres RNRs de classe I (*E. coli*, *A. thaliana* et souris). Ces études ont permis de mettre en évidence deux classes de RNRs, la RNR des procaryotes et celles des eucaryotes qui se distinguent par les caractéristiques RPE et la réactivité de leurs radicaux respectifs. Elles ont également permis de mettre en avant la réactivité particulière de thiols aromatiques et surtout celle du resvératrol, une phytoalexine naturelle, qui s'est avéré un remarquable inhibiteur de la RNR de mammifères et de plantes. Cette molécule pourrait ainsi avoir des applications en tant qu'agent anti-prolifératif ou chimiopréventif du cancer chez l'homme ou en tant qu'herbicide.